LIPOPHILE INHALTSSTOFFE DER BLÄTTER UND FRÜCHTE VON SYMPHORICARPUS ALBUS (L.) BLAKE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Irmgard Merfort
aus Vechta

Düsseldorf

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0006

LIPOPHILE INHALTSSTOFFE DER BLÄTTER UND FRÜCHTE VON SYMPHORICARPUS ALBUS (L) BLAKE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Irmgard Merfort

aus Vechta

Düsseldorf

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Willuhn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Möhrle

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 1980

meinen Eltern

Frank

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Willuhn am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Meinem Doktorvater,

Herrn Professor Dr. G. Willuhn,

danke ich herzlich für die stets hilfreiche Betreuung, Unterstützung und Förderung meiner Arbeit sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Großzügigkeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Zur Taxonomie und Systematik der Caprifoliaceae	6
C.	Lipophile Inhaltsstoffe der Blätter von Symphoricarpus albus	13
	I. Isolierung und Identifizierung lipophiler Substanzen aus dem Petrolätherextrakt	13
	1. Extraktion und DC-Untersuchung des Petrolätherextraktes und seines unverseifbaren Anteiles	13
	2. Fraktionierung des Petrolätherextraktes	15
	3. Die Triterpene	16
	3.1. Die verestert vorliegenden Triterpene	16
	3.1.1. Isolierung der sauren und neutralen Komponenten	16
	3.1.2. Charakterisierung durch GC-, DC- und IR-Analyse	18
	3.1.3. Identifizierung	22
	a) 24-Methylencycloartanol, 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol und Lupeol (Fraktion I)	22
	b) Butyrospermol (Fraktion II)	31
	c) Lanosta-7,24-dien-3ß-ol und ein nicht identifiziertes tetracyclisches Triterpen (Fraktion III)	33
	d) Cycloartenol und Lanosterol (Fraktion IV)	36
	e) Pentacyclische Triterpene (Fraktion V)	38

Seite

3.2. Die frei vorliegenden Triterpene 44

3.2.1. Isolierung 44

3.2.2. Identifizierung 45

4. Die Methylsterine 53

4.1. Die verestert vorliegenden Methylsterine 53

4.1.1. Isolierung und Identifizierung durch DC- und GC-Analyse 53

4.1.2. Präparative Auftrennung der Methylsterinacetate und Identifizierung von Gramisterol, Citrostadienol, Obtusifoliol, Cycloeucalenol, 31-Norlanosterol, 31-Norcycloartenol, 31-Norlanost-8-en-3ß-ol und Lophenol durch GC- und GC/MS-Analyse 55

a) Gramisterol (= 24-Methylenlophenol) - Fraktion I 55

b) Obtusifoliol und Cycloeucalenol - Fraktion II 58

c) Citrostadienol (= 24-Äthylidenlophenol) - Fraktion III 59

d) 31-Norlanosterol und 31-Norcycloartenol - Fraktion IV 60

e) 31-Norlanost-8-en-3ß-ol und Lophenol - Fraktion V 62

4.2. Die frei vorliegenden Methylsterine 67

4.2.1. Isolierung 67

4.2.2. Identifizierung 67

5. Die Sterine 68

5.1. Die frei vorliegenden Sterine 68

Seite

5.1.1. Isolierung 68

5.1.2. Charakterisierung durch Schmelzpunkt, spezifische Drehung und IR-Spektrum 69

5.1.3. Identifizierung durch GC und GC/MS 70

5.1.4. Auftrennung des acetylierten Steringemisches an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten und GC- sowie GC/MS-Analyse der einzelnen Fraktionen 76

5.2. Die verestert vorliegenden Sterine 81

6. Die sauren Komponenten der Triterpen-, Methylsterin- und Sterinester 84

6.1. Identifizierung durch DC und GC 84

6.2. Auftrennung in gesättigte und ungesättigte Fettsäuremethylester 85

6.3. Auftrennung der ungesättigten Fettsäuremethylester nach Anzahl der Doppelbindungen 86

7. Die Alkane 90

8. Die freien und veresterten primären aliphatischen Alkohole 93

9. Die sekundären aliphatischen Alkohole 97

9.1. Isolierung 97

9.2. Identifizierung 98

II. Isolierung und Identifizierung lipophiler Substanzen aus dem Aceton-Extrakt entfetteter Blätter 104

1. Nachweis glykosidisch gebundener Sterine 104

2. Die Steringlykoside und Acylsteringlykoside 106

Seite

2.1. Nachweis und Isolierung 106

2.2. Identifizierung der Acylsteringlykoside 108

2.2.1. Die Säurekomponente 108

2.2.2. Die Aglyka und die Zuckerkomponente der Acylsteringlykoside 108

2.3. Identifizierung der Steringlykoside 110

3. Die Triterpensäuren 111

3.1. Isolierung von Oleanolsäure, Ursolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure 111

3.2. Identifizierung von Ursolsäure und Oleanolsäure 113

3.3. Identifizierung der 2α-Hydroxyursolsäure 118

3.4. Nachweis von Ursol-/Oleanolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure in den Kutikularschichten der Blätter 122

III. Quantitative Bestimmungen 123

1. Quantitative Bestimmung der Ursolsäure und der Oleanolsäure 123

2. Quantitative Bestimmung der Sterine, ihrer Ester und Glykoside 124

D. Lipophile Inhaltsstoffe der Früchte von Symphoricarpus albus 129

I. Isolierung und Identifizierung lipophiler Inhaltsstoffe aus dem Petrolätherextrakt 129

1. Isolierung 129

2. Die frei und verestert vorliegenden Triterpene 130

3. Die frei und verestert vorliegenden Methylsterine 132

Seite

4. Die frei und verestert vorliegenden Sterine 132

5. Die Fettsäuren der Triterpen-, Methylsterin- und Sterinester 133

6. Die Alkane 135

7. Die frei und verestert vorliegenden primären aliphatischen Alkohole 136

8. Die sekundären aliphatischen Alkohole 137

II. Isolierung und Identifizierung von Steringlykosiden, Acylsteringlykosiden, Oleanol- und Ursolsäure sowie 2α-Hydroxyursolsäure 138

1. Isolierung 138

2. Die Steringlykoside 139

3. Die Acylsteringlykoside 139

4. Oleanolsäure, Ursolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure 140

III. Quantitative Bestimmungen 141

1. Quantitative Bestimmung der Ursolsäure und der Oleanolsäure 141

2. Quantitative Bestimmung der Gesamtsterine 141

E. Prüfung der akuten Toxizität des Petrolätherextraktes aus den Früchten von S. albus 142

F. DC-Untersuchungen einiger Caprifoliaceen-Arten 144

G. Diskussion 148

H. Zusammenfassung 166

J. Experimenteller Teil 170

I. Spektroskopische Methoden 170

II. Bestimmung physikalischer Konstanten 170

Seite

III. Chromatographische Methoden 171

1. Analytische Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren 171

1.1. Sterine, Methylsterine und Triterpene 171

1.2. Fettsäuren und Fettsäuremethylester 172

1.3. Sekundäre aliphatische Alkohole 174

1.4. Zucker 174

1.5. Steringlykoside, Acylsteringlykoside und Triterpensäuren 174

2. Präparative Dünnschichtchromatographie 175

3. Präparative Dickschichtchromatographie 175

4. Säulenchromatographie 176

5. Gaschromatographie 177

5.1. Geräte 177

5.2. Gaschromatographische Trennsysteme 177

5.2.1. GC der Triterpene 179

5.2.2. GC der Methylsterine 179

5.2.3. GC der Sterine 179

5.2.4. GC der Fettsäuren 180

5.2.5. GC der Alkane 180

5.2.6. GC der primären aliphatischen Alkohole 180

5.2.7. GC der sekundären aliphatischen Alkohole 180

5.2.8. GC der Triterpensäuren 180

5.2.9. GC der Zucker 181

IV. Derivatisierungen 181

1. Acetatbildung 181

2. Bildung der Methylester 181

3. Bildung der Alditolacetate 182

		Seite
V.	Herkunft und Ernte der Pflanzen	182
VI.	Der Petrolätherextrakt der Blätter	183
1.	Herstellung des Petrolätherextraktes und seines unverseifbaren Anteils	183
2.	Fraktionierung des Petrolätherextraktes	184
2.1.	Auftrennung durch Säulenchromatographie	184
2.2.	Auftrennung durch Trockensäulenchromatographie	186
3.	Triterpene, Methylsterine und Sterine	187
3.1.	Isolierung der Triterpene, Methylsterine und Sterine aus den Esterfraktionen F, G und H	187
3.2.	Isolierung der frei vorliegenden Triterpene, Methylsterine und Sterine	188
3.3.	DC-Trennung der verestert und frei vorliegenden Triterpene nach Acetylierung	189
4.	Fettsäuren der Esterfraktion G	190
4.1.	Isolierung	190
4.2.	Auftrennung in gesättigte und ungesättigte FSME nach Quecksilber-II-acetat-Adduktbildung	190
4.3.	Hydrierung der ungesättigten FSME	191
5.	Alkane	192
6.	Isolierung der primären aliphatischen Alkohole über Harnstoffadduktbildung	192
7.	Sekundäre aliphatische Alkohole	193
7.1.	Isolierung	193
7.2.	Oxidation zu Ketonen	193

Seite

7.3. Reduktion zu Alkanen 194

VI. Der Acetonextrakt der Blätter 194

1. Herstellung des Acetonextraktes und seines unverseifbaren Anteils 194

2. Isolierung der Sterine aus dem Unverseifbaren des Acetonextraktes 195

3. Steringlykoside und Acylsteringlykoside 195

3.1. Isolierung 195

3.2. Identifizierung der Acylsteringlykoside 196

3.2.1. Alkalische Hydrolyse 196

3.2.2. Saure Hydrolyse 196

3.3. Hydrolyse der Steringlykoside 196

4. Isolierung der Triterpensäuren 197

VII. Quantitative Bestimmungen 198

1. Quantitative Bestimmung der Ursol- und der Oleanolsäure 198

1.1. Herstellung der Extrakte 198

1.2. Durchführung der Messung 198

2. Quantitative Bestimmung der Sterine, ihrer Ester und Glykoside 200

2.1. Erstellung der Eichkurve 200

2.2. Herstellung der Extrakte 201

2.3. Bestimmung der Gesamtsterine, der freien Sterine sowie der freien und veresterten Sterine aus dem Acetonextrakt (Extrakt A) 201

2.4. Bestimmung der freien Sterine, der freien und veresterten Sterine sowie der veresterten Sterine aus dem Petrolätherextrakt (Extrakt B) 203

Seite

2.5. Bestimmung der glykosidisch gebundenen Sterine aus dem entfetteten Acetonextrakt (Extrakt C) 204

VIII. Der Petrolätherextrakt der Früchte 204

1. Herstellung des Petrolätherextraktes 204

2. Fraktionierung des Petrolätherextraktes durch Trockensäulenchromatographie 204

3. Isolierung der neutralen und sauren Esterbestandteile sowie der Alkane 205

4. Isolierung der frei vorliegenden Triterpene, Methylsterine und Sterine 206

5. Sekundäre Alkohole 206

IX. Der Acetonextrakt der Früchte 206

1. Herstellung des Acetonextraktes 206

2. Fraktionierung des Acetonextraktes 207

K. Literaturverzeichnis 209

A. Einleitung

Die Schneebeere, S y m p h o r i c a r p u s a l b u s (L.) Blake (= Symphoricarpus racemosus Michx.) ist ein in Nordamerika heimischer, aber auch in Europa verbreiteter, bis zu 2,5 m hoch werdender Strauch, der durch Heterophyllie, rötliche, einzeln stehende oder zu kurzen, unterbrochenen Ähren vereinigte Blüten sowie durch in der Natur nur selten vorkommende weiße Beeren gekennzeichnet ist. Aufgrund des letzten Merkmals erhielt er die deutsche Bezeichnung "Schneebeere". Der Strauch gehört zur chemisch wenig untersuchten Familie der Caprifoliaceae oder Geißblattgewächse (HEGNAUER, 1964), die in den heute gebräuchlichsten Pflanzensystemen (EHRENDORFER, 1978; FROHNE u. JENSEN, 1979) zusammen mit den Adoxaceae, Valerianaceae und Dipsacaceae die Ordnung der Dipsacales bildet. Da die Caprifoliaceae nach Ansicht vieler Autoren einen polyphyletischen Ursprung haben (s. HEGNAUER, 1964; HILLEBRAND u. FAIRBROTHERS, 1970a), ist die systematische Stellung dieser Familie im Pflanzensystem jedoch umstritten (WETTSTEIN, 1935; WAGENITZ, 1965; TAKHTAJAN, 1969; HUTCHINSON, 1973; DAHLGREN, 1975; BENSON, 1979; s. auch Abschnitt B, S. 6ff). Bei der Klärung der hier bestehenden Unstimmigkeiten könnten phytochemische Untersuchungen sehr hilfreich sein. Sie würden weitere Merkmale liefern, die zudem aus einem Bereich stammen, der bei der traditionellen Klassifizierung in der Regel nicht verwendet werden konnte.

Von den Caprifoliaceen werden derzeit Viburnum prunifolium und Sambucus nigra als Arzneipflanzen verwendet. Auch bei S. albus handelt es sich um eine alte Arzneipflanze, die jedoch heute

keine Bedeutung mehr hat. Lediglich im HOMÖOPATHISCHEN ARZNEIBUCH (1958) wird noch die frische Wurzel zur Essenzbereitung geführt, die bei Magenleiden, Dysmenorrhoe und Hyperemesis gravidarum angewendet wird. Die Wurzel gilt weiterhin äußerlich als leichtes Hautreizmittel. Innerlich bzw. parenteral soll sie zur unspezifischen Steigerung der Abwehrkräfte beitragen. Zusammen mit Euphorbium und Symphytum finden Auszüge aus der Wurzel bei Insuffizienz und Degeneration des Stütz- und Bindegewebes Anwendung. In Nordamerika wurden Stengel und Wurzel als Diaphoretikum gebraucht. Den Früchten wird bei Dysmenorrhoe, Hyperemesis gravidarum, Ödemen, Hauterkrankungen, Magenstörungen, Darmgeschwüren, Halsentzündungen, Wechselfieber und Verstopfungen eine Wirkung nachgesagt.
Die Beeren sollen giftig sein (z.B. FROHNE u. JENSEN, 1979), doch sind die Angaben hierüber nicht einheitlich (HUSEMANN, 1862; AMYOT, 1885; HERRMANN u. TOLLENS, 1885; GRESHOFF, 1909; FOURNIER, 1948; GARNIER und Mitarb., 1961; CHAPMAN-TURNER u. BELL, 1971; NGHIA und Mitarb., 1971; LIEBENOW u. LIEBENOW, 1973; GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974; CHAVANT und Mitarb., 1975; MADAUS, 1976; SZAUFFER und Mitarb., 1978).
Die Rinde dient zur Bereitung von Augenwässern. (Literatur zur Anwendung: BOAS, 1890; DRAGENDORFF, 1967; CHAPMAN-TURNER u. BELL, 1971; GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974; MADAUS, 1976; BRAUN, 1978).
Die hydrophilen Inhaltsstoffe von S. albus sind in Ansätzen bereits untersucht worden. In der älteren Literatur werden für die Blätter Saccharose, ein durch Emulsin spaltbares Glykosid und Saponine genannt (DANJOU, 1907; GRESHOFF, 1909; WEHMER, 1931),

für die Beeren Glucose, Fructose, Saccharose, Pektin, Eiweiß, Gummi sowie Äpfel-, Wein- und Zitronensäure (HERRMANN u. TOLLENS, 1885; BRIDEL, 1907; SMITH, 1913; NOWAK u. ZELLNER, 1922; WEHMER, 1931). In neuerer Zeit wurden in den Blättern und Zweigen die Cumarine Fraxin und Aesculin, in der Rinde nur Fraxin gefunden (PLOUVIER, 1968). Die Blätter führen nach BOHM u. GLENNIE (1971) die Flavonoide Luteolin-7-rutinosid, Luteolin-7-glucosid, Apigenin-7-rutinosid und Apigenin-7-glucosid. In den Beeren wurden Luteolin-7-rhamnoglucosid, Luteolin-7-glucosid und Quercetin-3-glucosid sowie Serin, Glutaminsäure, Aminobuttersäure, Chinasäure und Chlorogensäure gefunden (NGHIA und Mitarb., 1971; CHAVANT und Mitarb., 1975). Die Beeren und Wurzeln sollen Saponine und Gerbstoffe enthalten (LIEBENOW u. LIEBENOW, 1973; GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974; BRAUN, 1978). SZAUFFER und Mitarb. (1978) fanden bei Untersuchungen der ganzen Pflanze Spuren des Alkaloids Chelidonin und weitere noch unaufgeklärte Nebenalkaloide.

Über die lipophilen Bestandteile von S. albus ist dagegen wenig bekannt. Von WILLUHN (1974) wurden unter chemotaxonomischer Fragestellung die Alkane der Blätter untersucht. Bei SENDRA u. JANECZKO (1973) finden sich Angaben über das Vorkommen von ß-Sitosterin und Oleanolsäure in den Blättern. Hier wurde dabei lediglich der unverseifbare Anteil der lipophilen Extrakte analysiert und auf die Frage des nativen Vorliegens der Verbindungen nicht eingegangen. Desgleichen fehlen Angaben über den quantitativen Gehalt. Das Isomere der Oleanolsäure, die Ursolsäure, soll nach PLOUVIER (1974; 1975) in der Beere, nicht jedoch in den Blättern enthalten sein.

Die vorliegende Arbeit soll daher durch eine Analyse der lipophilen Inhaltsstoffe der Blätter und der Früchte von S y m p h o r i c a r p u s a l b u s die Kenntnisse auf diesem Gebiet erweitern. Die Untersuchungen werden dabei mit folgender Zielsetzung durchgeführt:

1. Isolierung und Identifizierung der Sterine, Methylsterine und Triterpene.
2. Untersuchung des nativen Vorliegens dieser Verbindungen.
3. Isolierung und Identifizierung der Triterpensäuren.
4. Quantitative Bestimmung der Gesamtsterine und einzelner Sterinderivate sowie der Triterpensäuren.
5. Isolierung und Identifizierung weiterer lipophiler Komponenten, die vor allem in der Kutikula, den epikutikulären Wachsschichten und den kutinisierten Wandschichten vorkommen. Hierbei handelt es sich um die homologen Reihen der Paraffine, primären und sekundären aliphatischen Alkohole und die Fettsäuren. Das Verteilungsmuster dieser homologen Reihen ist, insbesondere bei den ubiquitär vorkommenden Paraffinen, von chemotaxonomischem Wert, da diese als topographisch vom inneren Stoffwechsel relativ isolierte Stoffgruppe nicht weiter metabolisierende, stabile Endprodukte darstellen (vgl. u.a. PURDY u. TRUTER, 1961; EGLINTON und Mitarb., 1962; EGLINTON u. HAMILTON, 1963). Sie sind deshalb als geeignete Quelle phytochemischer Merkmale für taxonomische Fragestellungen bereits vielfach herangezogen worden, z.B. bei den Poaceae (MARTIN-SMITH und Mitarb., 1967) und den Asteraceae (BACHELOR und Mitarb., 1972). Die Analyse dieser Stoffgruppen könnte so auch für die Klärung

der umstrittenen phyletischen Einheitlichkeit der Familie der Caprifoliaceae hilfreiche chemische Merkmale liefern.

6. Schließlich sollen durch eine vergleichende DC-Untersuchung verschiedener Vertreter der Caprifoliaceae aus den Triben Sambuceae, Viburneae, Linnaeeae und Lonicereae (s. HEGNAUER, 1964) Hinweise auf das Vorkommen oder Fehlen der in S. albus-Blättern identifizierten Verbindungen in diesen Arten erhalten werden, was im Zusammenhang mit den bestehenden Schwierigkeiten einer natürlichen Gliederung der Caprifoliaceae hilfreich sein könnte (s. Abschnitt B, S. 6ff).
7. Weiterhin soll die akute Toxizität des Petrolätherextraktes der Früchte bestimmt werden, um zu sehen, ob lipophile Stoffe für die verschiedentlich angegebene Giftwirkung der Früchte verantwortlich gemacht werden können.

B. Zur Taxonomie und Systematik der Caprifoliaceae

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bildet die Familie der Caprifoliaceae mit ihren 300, zu 14-17 Gattungen zusammengefaßten Arten nach Ansicht vieler Autoren keine einheitliche natürliche Sippe. Die Heterogenität der Familie spiegelt sich bereits in den Schwierigkeiten wider, die Gattungen der Familie in einzelne Triben zu gliedern. Bis in die Gegenwart hinein sind hier immer wieder verschiedene Vorschläge unterbreitet worden, von denen einige auf S. 12 wiedergegeben sind. In der phylogenetischen Heterogenität vor allem dürfte auch die Ursache dafür zu suchen sein, daß bis heute unterschiedliche Auffassungen über die Einordnung der Familie in das natürliche Pflanzensystem existieren. Hier werden Beziehungen zu den Cornaceae und den Rubiaceae diskutiert, aufgrund derer dann die Familie der Caprifoliaceae in verschiedene Ordnungen untergebracht wird, so etwa in die der Araliales (HUTCHINSON, 1973) oder der Rubiales (WETTSTEIN, 1935; BENSON, 1979). Meistens jedoch wird sie derzeit zusammen mit den Adoxaceae, Valerianaceae und Dipsacaceae zur Ordnung der Dipsacales vereinigt (u.a. WAGENITZ, 1964; CRONQUIST, 1968; TAKHTAJAN, 1969; EHRENDORFER, 1978). Schließlich hat in neuerer Zeit DAHLGREN (1975) die Gattungen Sambucus und Viburnum von den Caprifoliaceae abgetrennt und sie als eigene Familie der Sambucaceae zusammen mit den Cornaceae zur Ordnung Cornales vereinigt, die er von den Araliales getrennt in die Nähe der Dipsacales stellt.
Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die aus dem morphologischen, anatomischen, embryologischen, palynologischen,

karyologischen, serologischen und phytochemischen Bereich stammenden Argumente gegeben werden, auf denen die unterschiedlichen Auffassungen über die Gliederung der Caprifoliaceae und ihre Einordnung im System basieren. Gleichzeitig sollen die Gründe aufgezeigt werden, warum die Gattung Symphoricarpus von einigen Autoren zum Tribus Linnaeeae, von anderen dagegen zum Tribus Lonicereae gestellt wird (s. S. 12).

Umfangreiche Untersuchungen der Blütenanatomie und -morphologie führten WILKINSON (1948a; 1948b; 1948c; 1949) zu dem Schluß, daß die Gattungen Sambucus und Viburnum einen von den anderen Gattungen der Familie abweichenden Ursprung haben und die vielfach zum Tribus Viburneae gestellte Gattung Triosteum hier nicht einzuordnen ist. Auch stengelanatomische Untersuchungen sprechen nach DE VOS (1951) für eine enge Verwandschaft zwischen Sambucus und Viburnum. Von den übrigen Gattungen der Familie unterscheiden sich diese beiden Gattungen darüber hinaus durch das zusätzliche Auftreten anderer Haarformen (WEBERLING, 1977). Arbeiten von TROLL u. WEBERLING (1966) über die Synfloreszenzen ergaben, daß nur die Gattungen Viburnum und Sambucus innerhalb der Familie die als ursprünglich anzusehenden monotelen Synfloreszenzen besitzen. Auch FUKUOKA (1972) kommt nach eingehenden blütenanatomischen und -morphologischen Untersuchungen zur Ansicht, daß die Gattungen Sambucus und Viburnum sich von den anderen Gattungen der Familie unterscheiden. Andererseits weist er darauf hin, daß die Unterschiede zwischen diesen beiden Gattungen selbst größer sind als die zwischen den anderen Gattungen der Familie. SUNESON (1933) konnte zeigen, daß nur die Gattung Viburnum neben den in der Evolution am höchsten

stehenden unitegmisch-tenuinucellaten Samenanlagen auch die primitiveren unitegmisch-crassinucellaten Samenanlagen besitzt (vgl. auch PHILIPSON, 1974).

Für eine engere Verwandtschaft zwischen Sambucus und Viburnum sprechen auch pollenanalytische und karyologische Untersuchungen. Die Pollen beider Gattungen sind ähnlich und von denen der übrigen Familienvertreter verschieden (BASSETT u. CROMPTON, 1970); gleiches gilt für die Chromosomen (SAX u. KRIBS, 1930).

Aufgrund serologischer Untersuchungen von HILLEBRAND u. FAIRBROTHERS (1970a; 1970b) läßt sich andererseits die Familie der Caprifoliaceae in drei Gruppen gliedern: die Gattung Viburnum, die Gattung Sambucus und die restlichen Gattungen. Dabei zeigte die Gattung Viburnum eine gewisse Ähnlichkeit lediglich mit der Gattung Sambucus, überhaupt keine Ähnlichkeit jedoch mit den anderen Caprifoliaceen-Gattungen. Die Ähnlichkeit der Gattung Sambucus mit diesen war andererseits nicht größer als mit Vertretern der Gattung Cornus aus der Familie der Cornaceae.

Auch aus dem phytochemischen Bereich sind bereits eine Reihe von Merkmalen für die schwierige Gliederung der Caprifoliaceae herangezogen worden. GIBBS (1956/57; 1974) beobachtete, daß das Holz der Zweige von Caprifoliaceen-Arten heterogen auf seinen Salzsäure/Methanol-Test reagierte, der auf das Vorkommen von Catechingerbstoffen hinweisen soll. Die meisten Sambucus- und Viburnum-Arten reagierten positiv, die anderen Arten der Familie negativ. BOHM u. GLENNIE (1971) fanden, daß sich die Flavonoidführung der Familie als Merkmalsquelle

für die taxonomische Gliederung einsetzen läßt. Hier zeigte sich, daß in den Gattungen Sambucus und Viburnum Flavonole dominieren, während in anderen Gattungen nur Flavone oder Flavonole vorkommen (Symphoricarpus und Triosteum bzw. Kolkwitzia, Weigela und Diervilla). In Lonicera herrschen Flavone vor, in den weiteren Gattungen sind Flavone und Flavonole gleichmäßig enthalten..

Interessant im Rahmen der Flavonoiduntersuchungen ist auch das Vorkommen von Amentoflavon in einigen Viburnum-Arten. Amentoflavon wurde bisher nur in Gymnospermen gefunden und wird von HARBORNE (1966) als primitives Merkmal gewertet. Auch durch diesen Befund wird die These unterstützt, daß Viburnum die primitivste Gattung innerhalb der Familie ist (s. auch DE VOS, 1951).

Auf eine engere Verwandtschaft von Sambucus und Viburnum deutet weiterhin das quantitative Verteilungsmuster der Alkane hin (WILLUHN, 1974), während sich andererseits die Carotinoide von Sambucus nigra und Viburnum opulus als unterschiedlich erwiesen (GOODWIN, 1966). Schließlich sind die bereits mehrfach für chemotaxonomische Fragestellungen herangezogenen Triterpene (u.a. PONSINET und Mitarb., 1968; MARTIN-SMITH und Mitarb., 1967; BANDARANAYAKE und Mitarb., 1977) in ersten Ansätzen auch bei den Caprifoliaceen bearbeitet worden. Hier fand PLOUVIER (1974; 1975), daß das Vorkommen von Ursolsäure nicht nur für die Caprifoliaceae, sondern für die ganze Ordnung der Dipsacales charakteristisch ist. Lediglich in Lonicera-Arten scheinen Triterpensäuren nicht so häufig aufzutreten. INOUE u. SATO (1975) haben die Triter-

penführung der Gattung Sambucus analysiert, in der α- und ß-Amyrin und die sich von ihnen ableitenden Säuren (Ursol- und Oleanolsäure) verbreitet sind.

Die bisher vorliegenden Befunde aus den verschiedensten Merkmalsquellen zeigen, daß sich die Gattungen Sambucus und Viburnum von den anderen Vertretern der Caprifoliaceen deutlich unterscheiden. Ob diese beiden Gattungen selbst so eng miteinander verwandt sind und die Unterschiede zu den anderen Caprifoliaceen-Gattungen als so gravierend anzusehen sind, um sie als eigenständige Familie der Sambucaceae von den Caprifoliaceae völlig abzutrennen, wie dies DAHLGREN (1975) macht, muß zur Zeit noch offen gehalten werden. OSKINA (1972) beläßt sie bei den Caprifoliaceae und vereinigt sie zum Tribus Viburneae, während FUKUOKA (1972) für beide Gattungen hier einen getrennten Tribus formuliert (s. auch S.12). Zweifellos würde die Familie der Caprifoliaceae durch die Herausnahme der Gattungen Sambucus und Viburnum eine größere Einheitlichkeit gewinnen, wodurch die bereits erwähnten Schwierigkeiten bei der Eingliederung der Familie verringert würden.

Doch auch über die natürliche Homogenität der Restfamilie besteht derzeit noch keine einheitliche Auffassung. Aufgrund durchgeführter Infloreszenz-Studien meinen TROLL u. WEBERLING (1966), daß die Gattungen Aleuosmia, Memecylanthus, Pachydiscus, Carlemannia und Silvianthus aus der Familie herausgenommen werden sollten. Unterschiedliche Vorstellungen existieren desweiteren über die Einordnung der Gattung Symphoricarpus. Meistens wird sie zusammen mit den Gattungen Linnaea, Kolkwitzia, Abelia und Dipelta zum Tribus Linnaeeae vereinigt

(u.a. HEGNAUER, 1964; WAGENITZ, 1964; FUKUOKA, 1972; s.S.12). TROLL u. WEBERLING (1966) verneinen jedoch aufgrund von blütenanatomischen Untersuchungen die Zugehörigkeit zu diesem Tribus und postulieren eine größere Verwandtschaft zum Tribus Lonicereae. Die gleiche Auffassung hat OSKINA (1972), der die Gattung Symphoricarpus in den Tribus Lonicereae stellt, wobei er die doch vorhandenen größeren Unterschiede zu den Gattungen dieses Tribus durch Aufstellung eines eigenen Subtribus Symphoricarpinae hervorhebt (s.S.12). Die Richtigkeit seines Systems sieht OSKINA (1974) durch Untersuchungen über die Chromosomenzahl bestätigt. Zur Klärung dieser umstrittenen Stellung der Gattung Symphoricarpus müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wobei insbesondere chemische Merkmale sehr hilfreich sein könnten.

DIE FAMILIE DER CAPRIFOLIACEAE

DE CANDOLLE (1830)

SAMBUCEAE : Sambucus, Viburnum
LONICEREAE : Triosteum, Diervilla, Lonicera, Leycesteria, Symphoricarpus, Abelia, Linnaea, Aida, Valentia, Karpeton

BENTHAM und HOOKER (1873)

SAMBUCEAE : Adoxa, Sambucus, Viburnum
LONICEREAE : Microsplenium, Triosteum, Symphoricarpus, Abelia, Linnaea, Lonicera, Leycesteria, Diervilla, Pentapyxis, Aleuosmia

FRITSCH (1892)

SAMBUCEAE : Sambucus
VIBURNEAE : Viburnum - ? Triosteum
LINNAEEAE : Symphoricarpus, Dipelta, Linnaea
LONICEREAE : Aleuosmia, Lonicera, Diervilla, Leycesteria

HEGNAUER (1964)

SAMBUCEAE : Sambucus, Triosteum
VIBURNEAE : Viburnum
LINNAEEAE : Dipelta, Heptacodium, Kolkwitzia, Linnaea, Abelia, Symphoricarpus
LONICEREAE : Aleuosmia, Calyptrostigma, Diervilla, Leycesteria, Lonicera, Memecylanthus, Pachydiscus, Weigela

WAGENITZ (1964)

LONICEREAE : Leycesteria, Lonicera
DIERVILLEAE : Diervilla, Weigela - ? Carlemannia, ? Silvianthus
LINNAEEAE : Symphoricarpus, Kolkwitzia, Dipelta, Abelia, Linnaea
VIBURNEAE : Viburnum - ? Triosteum
SAMBUCEAE : Sambucus

FUKUOKA (1972)

SAMBUCEAE : Sambucus
VIBURNEAE : Viburnum
TRIOSTEAE : Triosteum
LINNAEEAE : Symphoricarpus, Linnaea, Dipelta, Kolkwitzia, Abelia, Zabelia
DIERVILLEAE : Macrodiervilla, Diervilla, Weigela
LONICEREAE : Leycesteria, Lonicera, Heptacodium

OSKINA (1972)

Tribus LONICEREAE	Subtribus LONICERINAE	: Lonicera, Leycesteria, Triosteum
	Subtribus SYMPHORICARPINAE	: Symphoricarpus
Tribus VIBURNEAE		: Viburnum, Sambucus
Tribus ABELIEAE	Subtribus ABELINAE	: Abelia, Linnaea
	Subtribus DIPELTINAE	: Dipelta, Kolkwitzia
Tribus PACHYDISCEAE		: Pachydiscus, Aleuosmia, Memecylanthus
Tribus DIERVILLEAE		: Diervilla, Weigela
Tribus HEPTACODIEAE		: Heptacodium

C. Lipophile Inhaltsstoffe der Blätter von Symphoricarpus albus

I. Isolierung und Identifizierung lipophiler Substanzen aus dem Petrolätherextrakt

1. Extraktion und DC-Untersuchung des Petrolätherextraktes und seines unverseifbaren Anteiles

Die lipophilen Bestandteile wurden den getrockneten und gemahlenen Blättern der Schneebeere im Soxhletverfahren entzogen. Die Ausbeute an petrolätherlöslichen Lipiden betrug, auf das Blatt-Trockengewicht bezogen, 3,29 %.

Anschließend wurde der Petrolätherextrakt sowie sein unverseifbarer Anteil (Herstellung s. Exp. Teil,S. 183) im DC-System I dünnschichtchromatographisch* untersucht. Als Detektionsmittel dienten LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz und Molybdatophosphorsäure. Anhand von Vergleichssubstanzen ließen sich im Petrolätherextrakt freie Sterine, Methylsterine, Triterpene, Sterin- und Triterpenester, sekundäre Alkohole und Alkane neben anderen nicht zugeordneten Begleitstoffen nachweisen (s. Abb. 1). Die Anwesenheit von primären Alkoholen und ihren Estern war nicht auszuschließen. Im Unverseifbaren war wegen der erfolgten Esterspaltung der Fleck in der Esterzone reduziert und nur noch den Alkanen sowie alkalisch nur unvollständig

---

* Im folgenden wird für dünnschichtchromatographisch und Dünnschichtchromatographie bzw. Dünnschichtchromatogramm die Abkürzung dc bzw. DC verwendet, für säulenchromatographisch und Säulenchromatographie sc bzw. SC, für gaschromatographisch und Gaschromatographie gc bzw. GC, für relative Retentionszeit RRT.

verseifbaren Blattwachsen zuzuordnen. Dèr Fleck in Höhe mitchromatographierter Sterine, Methylsterine und Triterpene war vergrößert, was darauf hindeutete, daß diese Verbindungen teilweise verestert vorgelegen haben.

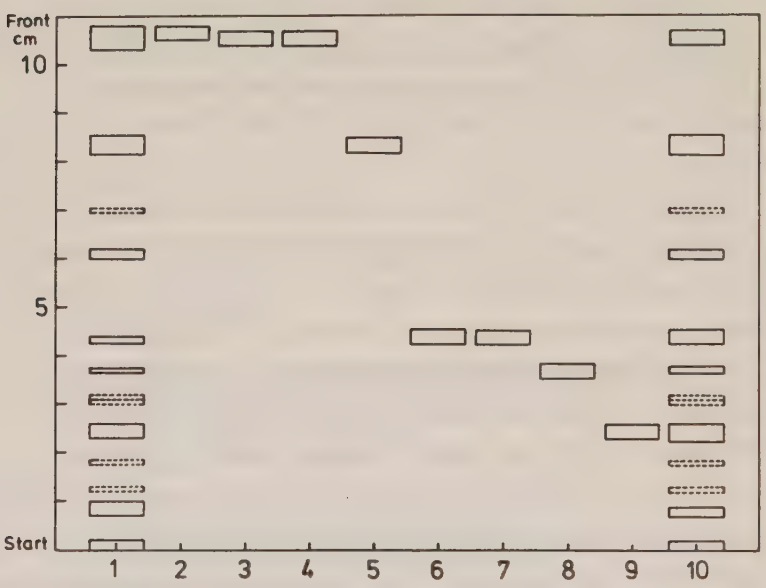


Abbildung 1 : DC des Petrolätherextraktes (1) und seines unverseifbaren Anteils (10) sowie der identifizierten Substanzgruppen (DC-System I)

2 : Alkane

3 : Primäre Alkoholester

4 : Fettsäureester der Triterpene, Methylsterine und Sterine

5 : Sekundäre Alkohole

6 : Primäre Alkohole

7 : Triterpene

8 : Methylsterine

9 : Sterine

2. Fraktionierung des Petrolätherextraktes

Zur Isolierung der dc nachgewiesenen Komponenten des Petrolätherextraktes wurden 10 g Extrakt sc an Aluminiumoxid unter schrittweiser Polarisierung des Elutionsmittels fraktioniert (NAGASAMPAGI und Mitarb., 1971; FUJINO u. OHNISHI, 1979). Die dabei erzielte Auftrennung wurde durch DC-Kontrolle der aufgefangenen Fraktionen verfolgt (s. Tab. 25, S. 185). Als erstes wurden Kohlenwasserstoffe von der Säule eluiert (Fraktion A), deren Analyse auf S. 90ff beschrieben wird. Die anschließenden Fraktionen enthielten Triterpen-, Methylsterin-, Sterin- und Alkoholester und wurden zu Fraktion B vereinigt. Darauf folgten die sekundären Alkohole (Fraktion C), auf deren Untersuchung auf S. 97ff eingegangen wird. Die freien Triterpene, Methylsterine und aliphatischen Alkohole wurden zu einer Fraktion D vereinigt. Im Anschluß daran wurden die freien Sterine eluiert (Fraktion E) (s. Exp. Teil, S. 184ff).

Die eben beschriebene sc Auftrennung des Petrolätherextraktes nimmt wegen der langen Elutionsdauer und der DC-Überprüfung der einzelnen Fraktionen relativ viel Zeit in Anspruch. Dieser Nachteil entfällt bei der Trockensäulenchromatographie bei gleichbleibender guter Trennleistung (LOEV u. GOODMAN, 1967). In einem zweiten Ansatz wurden deshalb weitere 9 g Petrolätherextrakt an drei Kieselgel-Trockensäulen aufgetrennt. Nach erfolgter Entwicklung der Säulen mit dem Fließmittel Toluol/ Petroläther (65 : 35, v : v), bei dem die freien Triterpene, Sterine und Methylsterine fast am Start liegen bleiben und die entsprechenden Ester an die Fließmittelfront wandern,

wurde die Säule in gleiche Teile geschnitten und diese nach erfolgter Elution mit Chloroform/Methanol dc überprüft. Auf diesem Wege wurde fast die gleiche Auftrennung wie bei dem oben beschriebenen Verfahren erzielt (s. Tab. 26, S. 186). Lediglich die freien Sterine fielen hierbei nicht allein, sondern zusammen mit den Triterpenen und Methylsterinen an (s. Exp. Teil, S. 186). Aus den nach beiden Verfahren erhaltenen Fraktionen wurde die Isolierung der einzelnen Substanzen bzw. Substanzgruppen vorgenommen.

3. Die Triterpene

3.1. Die verestert vorliegenden Triterpene

3.1.1. Isolierung der sauren und neutralen Komponenten

Der direkte DC-Vergleich des Petrolätherextraktes und des daraus gewonnenen unverseifbaren Anteils lieferte Hinweise dafür, daß die Triterpene in den Blättern größtenteils verestert vorlagen. Zu ihrer Isolierung wurde zunächst von der bei der Trocken-SC erhaltenen Fraktion G ausgegangen. Diese zeigte im DC nur einen Fleck in Laufhöhe von mitchromatographierten Triterpen- und Sterinestern. Mit Molybdatophosphorsäure färbte er sich braun bis braunviolett, was auf das Vorliegen von Triterpen- und Sterinestern in dieser Fraktion hindeutete. 390 mg der Esterfraktion wurden alkalisch verseift (s. Exp. Teil, S. 187). Die Extraktion des Hydrolysats mit Petroläther ergab 304 mg neutrale Esterbestandteile. Nach Ansäuern der wäßrigen Lösung (pH 1) und Ausschütteln mit Petroläther fielen 64,7 mg saure Esterbestandteile (= Fettsäuren) an. Ihre Identifizierung wird auf S. 84ff beschrieben (s. Exp. Teil, S. 190).

Die DC-Untersuchung der neutralen Esterbestandteile im System I ergab, daß hier wie vermutet Triterpene, Methylsterine und Sterine verestert vorgelegen hatten. Diese drei Substanzgruppen wurden sc an Kieselgel mit einem Petroläther/Äthylacetat/Toluol-Gemisch voneinander getrennt (s. Exp. Teil, 187ff) Hierbei wurden 5 mg einer aus weißen Kristallen bestehenden Triterpenfraktion erhalten, die nach Umkristallisation aus Methanol bei 122-124 °C schmolz und in den DC-Systemen I-IV einheitlich war. Weiterhin fielen nach nochmaliger sc Reinigung 58 mg Triterpene an, die ebenfalls in den DC-Systemen I-IV einen einheitlichen Fleck ergaben, deren wachsartige Konsistenz jedoch auf die Anwesenheit von höheren aliphatischen Alkoholen hindeutete. Diese fallen bei der chromatographischen Isolierung häufig gemeinsam mit den Triterpenen an (vgl. u.a. WAN und Mitarb., 1972; WILLUHN u. KÖSTENS, 1974; WILLUHN u. RICHTER, 1977) und haben in den Systemen I-IV die gleiche Laufhöhe. Ihre gleichzeitige Anwesenheit kann sicher gc festgestellt werden. Die GC-Untersuchung der kristallin und der wachsartig anfallenden Triterpene an einer OV-17-Säule ergab, daß in letzterer Fraktion neben Triterpenen zusätzlich aliphatische Alkohole enthalten waren. Ihr Anteil an der Gesamtfraktion betrug etwa 34 %.

Zur Isolierung weiterer verestert vorliegender Triterpene wurden die bei der Trocken-SC erhaltenen Esterfraktionen F und H herangezogen und analog wie Fraktion G behandelt (s. Exp. Teil, 187ff)

Insgesamt wurden nach Hydrolyse der Esterfraktionen 86,6 mg Triterpene erhalten, die noch mit aliphatischen Alkoholen

vergesellschaftet waren und 5 mg kristalline Triterpene ohne aliphatische Alkohole.

3.1.2. Charakterisierung durch GC-, DC- und IR-Analyse

Die isolierte, im DC-System I einheitliche Triterpenfraktion wurde zunächst gc an einer OV-17-Säule untersucht, die gute Trennleistungen für diese Stoffgruppe bietet (vgl. u.a. ITOH und Mitarb., 1974a; PALMER u. BOWDEN, 1975). Im Chromatogramm erschienen vier Peaks (s. Abb. 2), von denen die ersten drei nach direktem Vergleich und aufgrund der relativen Retentionszeiten, bezogen auf ß-Sitosterin (ITOH und Mitarb., 1974a), mit Lanosterol, Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol identisch waren (RRT 1,07, 1,24, 1,36 und 1,54).

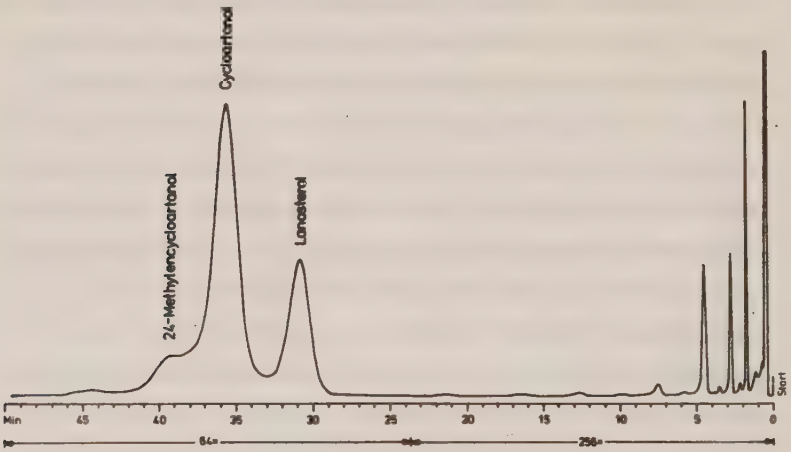


Abbildung 2 : GC der aus der Esterfraktion nach Hydrolyse isolierten Triterpenfraktion
(Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

Die Anwesenheit von Triterpenen mit einer endständigen Methylengruppe, wie bei 24-Methylencycloartanol, konnte auch dem IR-Spektrum entnommen werden (Banden bei 1645 und 890 cm^{-1}), desgleichen das Vorliegen eines Triterpens mit einer unsubstituierten Methylengruppe in einem Cyclopropanring wie bei Cycloartenol (deutliche Absorption bei 3040 cm^{-1}, COLE, 1956; WILLIAMS u. FLEMING, 1975).
Da die Retentionszeiten verschiedener Triterpene bei der GC-Analyse z.T. nur sehr geringe Unterschiede aufweisen und es insbesondere bei ungünstigen Mengenverhältnissen in einem Triterpengemisch zu Überlappungen der Peakflächen kommen kann, war für eine sichere gc Identifizierung der Komponenten eine vorherige weitere Fraktionierung der Triterpenfraktion wünschenswert.

DC-Untersuchungen in den verschiedenen Fließmitteln (System I-IV) an Kieselgel ergaben, daß hierbei eine Auftrennung des Triterpengemisches nicht möglich war. In den Chromatogrammen erschien jeweils nur ein Fleck in gleicher Laufhöhe wie sämtliche zum Vergleich zur Verfügung stehende tetracyclische und pentacyclische Triterpene (hRf-Werte: 55, 8, 77 bzw. 37).
Eine Auftrennung war jedoch an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten zu erwarten, an denen darüber hinaus die aliphatischen Alkohole von den Triterpenen abgetrennt werden können (WILLUHN u. KÖSTENS, 1974). Das Trennprinzip beruht hierbei auf der π-Komplexbildung der Silberionen mit den Doppelbindungen der zu trennenden Moleküle, deren Anzahl, Lage und räumliche Anordnung die Auftrennung beeinflussen. In

der Literatur finden sich für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode bei den Triterpenen bereits zahlreiche Hinweise (vgl. u.a. IKAN, 1965; FISCHER u. HERTEL, 1968; KÖSTENS, 1973; WILLUHN u. RICHTER, 1977; ITOH und Mitarb., 1978a). Da hierbei die Trennschärfe der Triterpenacetate besser als die der freien Verbindungen ist, wurde ein Teil der Triterpenfraktion acetyliert (s. Exp. Teil,S. 181) und an mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel aufgetrennt (System V). Im DC zeigten sich nach Detektion mit Molybdatophosphorsäure fünf Flecken (s. Abb. 3; hRf 60, 68, 71, 78 und 86).

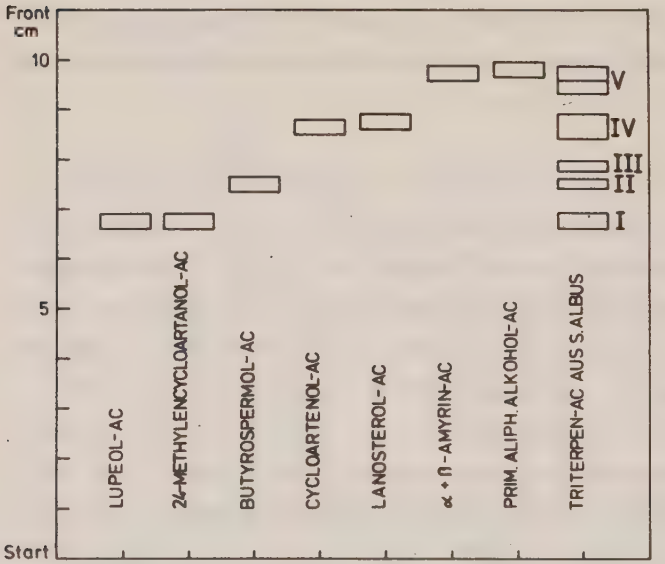


Abbildung 3 : DC der acetylierten, aus der Esterfraktion nach Hydrolyse erhaltenen Triterpene an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgel-Platten (DC-System V)

Die Komponente mit dem niedrigsten Rf-Wert stimmte mit mitchromatographiertem 24-Methylencycloartanolacetat* überein, auf dessen Vorliegen bereits aus der GC-Untersuchung und dem IR-Spektrum geschlossen werden durfte. Da aber 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat und auch Lupeolacetat sowie wahrscheinlich auch weitere Triterpenacetate mit einer $\Delta^{24\ (28)}$-Doppelbindung in diesem System gleiches Laufverhalten zeigen, kann das gleichzeitige Auftreten dieser Verbindungen nicht ausgeschlossen werden.

Die zweite Komponente (hRf 68) war identisch mit Butyrospermolacetat.

Der dritte Fleck (hRf 71) konnte wegen fehlender Vergleichssubstanzen keiner Verbindung zugeordnet werden.

Die Hauptkomponente mit dem hRf 78 erschien auf der Höhe von Cycloartenolacetat und Lanosterolacetat, die sich in diesem System nicht trennen (vgl. auch ITOH und Mitarb., 1977a). Aus dem GC der nicht acetylierten Triterpene an der OV-17-Säule (s. Abb. 2) kann mit dem Vorliegen beider Verbindungen gerechnet werden.

Der aus zwei Komponenten bestehende fünfte Fleck (hRf 86) lag auf gleicher Höhe wie die acetylierten pentacyclischen Triterpene α- und ß-Amyrin sowie ein Gemisch aliphatischer Alkoholacetate.

---

* Herrn Prof. Dr. T. Matsumoto, Nihon Universität Tokio, danke ich für die Überlassung von 24-Methylencycloartanolacetat, 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat, Lupeolacetat und Butyrospermolacetat.

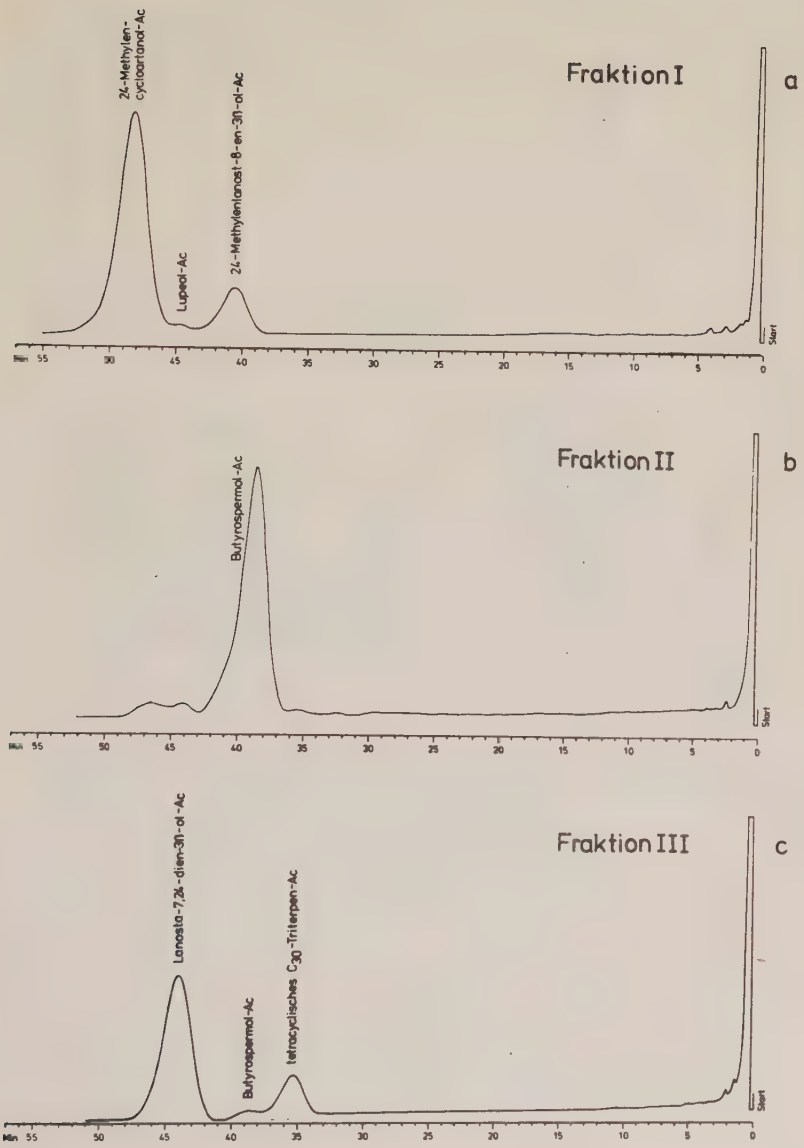
Aufgrund der durchgeführten GC- und DC-Analysen handelt es sich bei der isolierten Triterpenfraktion um ein Gemisch mehrerer tetracyclischer und pentacyclischer Triterpene, in dem neben weiteren Komponenten die Anwesenheit von Lanosterol, Cycloartenol, 24-Methylencycloartanol und Butyrospermol wahrscheinlich gemacht werden konnte.

3.1.3. Identifizierung

Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten wurden 35 mg der acetylierten Triterpenfraktion im System V an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgel-Platten präparativ aufgetrennt (s. Exp. Teil,S. 189) und die hierbei erhaltenen Fraktionen I-V (s. Abb. 3) jeweils einer GC- und GC/MS-Analyse unterworfen, die für die Identifizierung von Triterpenen heute die Methode der Wahl ist.

a) 24-Methylencycloartanol, 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol und Lupeol (Fraktion I)

Die im DC-System V einheitliche Fraktion I trennte sich gc an der OV-17-Säule in drei Komponenten auf (s. Abb. 4a), deren Retentionszeiten im direkten Vergleich identisch waren mit denjenigen der Acetate von 24-Methylencycloartanol, 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol und Lupeol. Auch die relativen Retentionszeiten (RRT), bezogen auf ß-Sitosterin, stimmten mit den in der Literatur für diese Verbindungen angegebenen Werten für diese Säule überein (ITOH und Mitarb., 1974a; 1976a; JEONG und Mitarb., 1975a).


24-Methylen-cycloartanol-Ac
Lupeol-Ac
24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-Ac
Fraktion I
a
Start
Min 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0
Butyrospermol-Ac
Fraktion II
b
Start
Min 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0
Lanosta-7,24-dien-3ß-ol-Ac
Butyrospermol-Ac
tetracyclisches C30-Triterpen-Ac
Fraktion III
c
Start
Min 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0

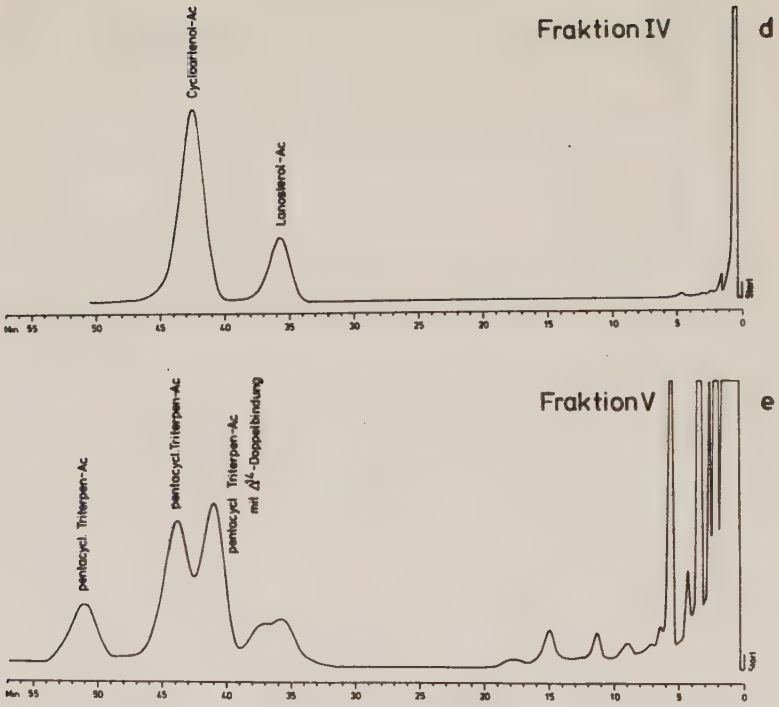


Abbildung 4 a-e : Gaschromatogramme der isolierten Triterpenfraktionen I-V, s. Abb. 3, S. 20

(Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde eine GC/MS-Analyse an einer OV-101-Kapillarsäule durchgeführt. Auch in diesem System besaßen die drei Triterpenacetate dieselben Retentionszeiten wie 24-Methylencycloartanol-, 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol- und Lupeolacetat (6,5, 5,7 bzw. 5,5 Min.).

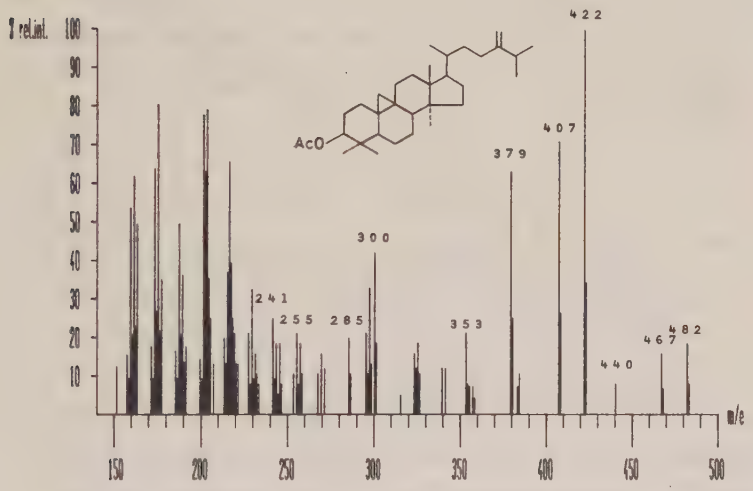
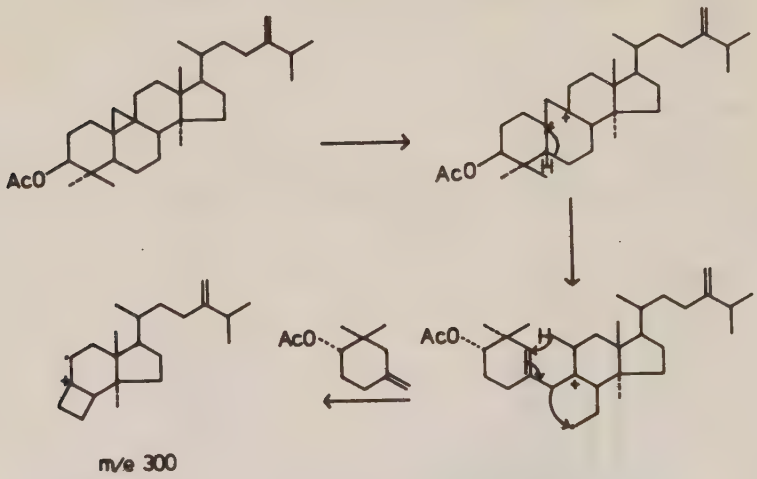


Abbildung 5 : Massenspektrum von 24-Methylencycloartanolacetat

Das Massenspektrum der ersten Komponente (s. Abb. 5) stimmte mit demjenigen überein, das unmittelbar danach von 24-Methylencycloartanolacetat aufgenommen wurde. Es zeigt die für tetracyclische Triterpene mit einem 9,19-Cyclopropanring charakteristischen Fragmente (vgl. auch APLIN u. HORNBY, 1966; AUDIER und Mitarb., 1966; ITOH und Mitarb., 1977a; NIELSEN und Mitarb., 1979).

Bei diesen Verbindungen kommt es unter Öffnung des Cyclopropanringes und einer McLafferty-Umlagerung zum Verlust des Ringes A und eines Wasserstoffatoms, wie dieses für 24-Methylencycloartanolacetat im folgenden Schema dargestellt ist:



Das dabei entstehende Spaltprodukt hat bei 24-Methylencycloartanol die Massenzahl m/e 300. Es ist unabhängig von der Substitution des Ringes A an C-4. Seine Massenzahl unterscheidet sich bei verschiedenen 9,19-Cyclopropan-Triterpenen und -Methylsterinen lediglich durch die Differenz der Massenunterschiede ihrer Seitenketten. Von diesem Spaltprodukt wird anschließend die anguläre Methylgruppe und die Seitenkette abgespalten, wodurch bei 24-Methylencycloartanol die Fragmente m/e 285 bzw. m/e 175 gebildet werden.

Die Triterpenacetate geben im Massenspektrum einen Molekülpeak. Immer auftretende Spaltprodukte resultieren aus der Abspaltung

einer angulären Methylgruppe, der Acetatgruppe sowie beider Gruppen, wodurch bei 24-Methylencycloartanolacetat die Fragmente m/e 467 (M^+-CH_3), m/e 422 (M^+-AcOH) und m/e 407 [M^+-(CH_3 + AcOH)] gebildet werden. Der Molekülpeak und diese Fragmente zeigen, daß es sich bei dieser Verbindung um ein C_{31}-Triterpenacetat handelt. Weitere charakteristische Fragmente entstehen durch Abspaltung der Seitenkette an C-17. Aus den hieraus resultierenden Massenzahlen m/e 357 (M^+-SK) und m/e 297 [M^+-(SK + AcOH)] geht hervor, daß diese Seitenkette aus neun C-Atomen mit einer Doppelbindung besteht. Seitenketten, die eine Doppelbindung tragen, können dabei auch zusammen mit zwei H-Atomen aus dem Ringsystem abgespalten werden, was die Fragmente m/e 355 bzw. 295 hervorruft (s. Tab. 1, S. 43). Weiterhin erfolgt bei den tetracyclischen Triterpenen wie bei den Steroiden leicht eine Spaltung zwischen den C-Atomen 13 und 17. Dieses Primärspaltprodukt wird weiter abgebaut, wobei am häufigsten ein Bruch zwischen der Bindung C-14 und C-15 stattfindet. Als Spaltprodukte treten bei 24-Methylencycloartanolacetat hierdurch die Fragmente m/e 315 [M^+-(SK + 42)] und m/e 255 [M^+-(SK + 42 + AcOH)] auf. Anders als beim Cholestanringsystem der Steroide spielen diese Spaltprodukte beim tetracyclischen Lanostanringsystem jedoch nur eine relativ untergeordnete Rolle. Hier wird diese Fragmentierung durch die Anwesenheit der Methylgruppe an C-14 beeinflußt, die gleichzeitig als Methylengruppe eliminiert wird. Das dominierende Auftreten der beiden Fragmente m/e 301 [M^+-(SK + 42 + CH_2)] und m/e 241 [M^+-(SK + 42 + CH_2 + AcOH)] belegt damit die Anwesenheit der Methylgruppe an C-14 (s. Tab. 1, S. 43).

Das bei tetracyclischen Triterpenen mit einem 9,19-Cyclopropanring auftretende Fragment m/e 353 wird durch Sprengung der Bindung zwischen C-1 und C-2 sowie C-4 und C-5 gebildet $[M^+-(AcOH + 69\ (C_5H_9)]$. Die Entstehung des ebenfalls charakteristischen Spaltprodukts m/e 379 ist noch nicht geklärt.

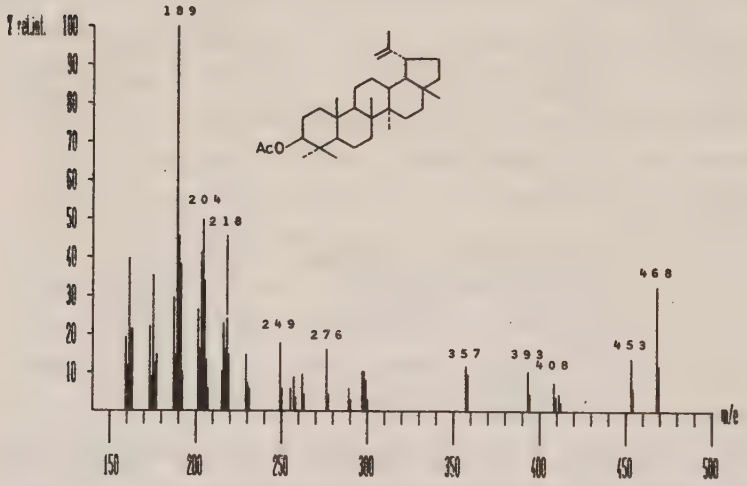


Abbildung 6 : Massenspektrum von Lupeolacetat

Die Identität der zweiten Komponente in dieser Fraktion mit Lupeolacetat wurde ebenfalls durch den direkten Vergleich der Massenspektren bestätigt. Bei Lupeol handelt es sich um ein pentacyclisches Triterpen (s. Abb. 6). Für diese ist typisch, daß abgesehen vom Verlust einer Methylgruppe und der Abspaltung von Wasser (beim Acetat von AcOH) sowie beider Gruppen, keine weiteren charakteristischen Spaltprodukte im Bereich des

Molekülions auftreten. Die für Lupeolacetat charakteristischen Spaltprodukte entstehen durch Fragmentierung innerhalb des Ringes C (a-c; s. Abb. 7).

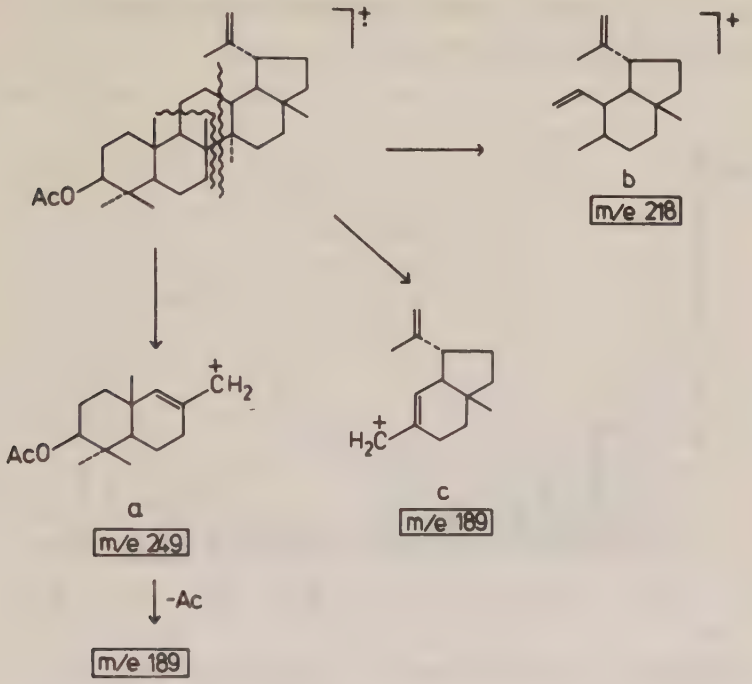


Abbildung 7 : Bildung der charakteristischen Fragmente von Lupeolacetat

Im Gegensatz zu Verbindungen vom Lupantyp mit einer gesättigten Isopropylgruppe ist die Abspaltung des Isopropenylrestes (M^+-41) hier zu vernachlässigen (vgl. BUDZIKIEWICZ und Mitarb., 1963; WALLER, 1972). Insgesamt ergibt sich folgende Fragmentierung : M^+: 468 (32 %); M^+-CH_3: 453 (14 %); M^+-AcOH:

408 (7 %); M^+-(CH_3 + AcOH): 393 (10 %); sowie m/e 357 (12 %); 299 (8 %); 289 (6 %); 276 (16 %); 249 (17 %); 218 (46 %); 205 (34 %); 204 (50 %); 203 (41 %); 189 (100 %) (vgl. u.a. PALMER u. BOWDEN, 1975; ULUBELEN und Mitarb., 1977; ITOH und Mitarb., 1978a).

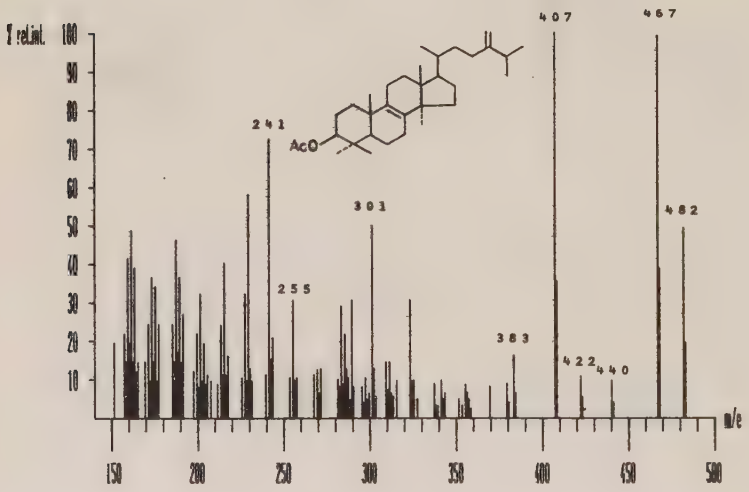


Abbildung 8 : Massenspektrum von 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat

Das Massenspektrum der dritten Komponente stimmte mit dem Vergleichsspektrum von 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat überein (s. Abb. 8). Es treten hier keine so charakteristischen Spaltprodukte wie bei Verbindungen mit einem 9,19-Cyclopropanring auf (s. Tab.1, S. 43). Die Fragmentierung beschränkt sich auf die Seitenkette und den Ring D (WYLLIE u. DJERASSI,

1968; MUCCINO u. DJERASSI, 1974). Neben den für ein C_{31}-Triterpenacetat typischen Fragmenten von 467 (M^+-CH_3), 422 (M^+-AcOH) und 407 [M^+-(CH_3 + AcOH)] werden durch Abspaltung der Seitenkette und eines Teils von Ring D (C_{15}-C_{17}) das Fragment m/e 315 und durch zusätzlichen Verlust der Acetatgruppe das Fragment m/e 255 gebildet, was das Vorliegen einer Seitenkette mit neun C-Atomen und einer Doppelbindung beweist. Die jeweils um 14 Masseneinheiten niedrigeren Fragmente m/e 301 und 241 entstehen durch weitere Abspaltung einer Methylengruppe und belegen die Anwesenheit einer Methylgruppe an C-14. Durch eine McLafferty-Umlagerung entsteht nach Abspaltung eines Teils der Seitenkette und einer Methylgruppe das Fragment m/e 383 sowie nach Verlust der Acetatgruppe das Spaltprodukt m/e 323, eine Spaltung, die charakteristisch für Verbindungen mit einer $\Delta^{24\ (28)}$-Doppelbindung ist (GOAD und Mitarb., 1967; MASSEY u. DJERASSI, 1979). Das Spektrum stimmte auch in anderen Bereichen mit dem Vergleichsspektrum und mit den in der Literatur angegeben Daten für 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat überein (JEONG und Mitarb., 1975a; GOULSTON und Mitarb., 1975; ITOH und Mitarb., 1977a).
Die Fraktion I setzt sich nach den durchgeführten dc, gc und gc/ms Untersuchungen aus den Acetaten von 24-Methylencycloartanol, Lupeol und 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol zusammen.

b) Butyrospermol (Fraktion II)

Fraktion II war dc im System V (hRf 68) und gc an der OV-17-Säule (RRT bezogen auf ß-Sitosterin 1,38; ITOH und Mitarb., 1974a: 1,38) sowie an der OV-101-Kapillarsäule (RT 4,9) mit der

Vergleichssubstanz Butyrospermolacetat identisch. Das Massenspektrum stimmte sowohl in der Fragmentierung als auch in der relativen Intensität der einzelnen Fragmentpeaks mit dem unmittelbar danach aufgenommenen Spektrum von Butyrospermolacetat überein (s. Abb. 9; vgl. auch ITOH und Mitarb., 1974b).

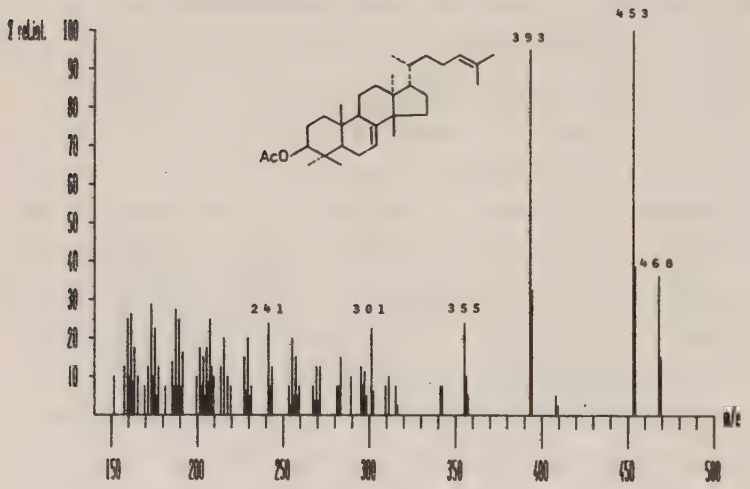


Abbildung 9 : Massenspektrum von Butyrospermolacetat

Die Fragmentierung erfolgt hier in gleicher Weise wie für 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat beschrieben wurde. Lediglich das Fragment M^+-[CH_3 + 84 (C_{23}-C_{27} + 1H)] wird hier nicht gebildet, da bei Butyrospermol eine $\Delta^{24\ (25)}$- und keine $\Delta^{24\ (28)}$-Doppelbindung vorliegt (s. Tab. 1, S. 43). Butyrospermol gehört zur Euphan-Serie, bei der die Seitenkette an C-17 α- und nicht ß-ständig wie beim Lanostangerüst

ist. Hierauf dürfte die relativ stärkere Abspaltung der Seitenkette unter Addition von zwei H-Atomen aus dem Ringsystem zurückzuführen sein (s. Tab.1,S. 43). Diese an C-17 stereoisomeren Verbindungsklassen werden an der verwendeten OV-17-Säule gaschromatographisch getrennt (s. ITOH und Mitarb., 1976b).

Aufgrund der durchgeführten DC-, GC- und GC/MS-Analysen handelt es sich bei Fraktion II um Butyrospermolacetat.

c) Lanosta-7,24-dien-3ß-ol und ein nicht identifiziertes tetracyclisches Triterpen (Fraktion III)

Fraktion III zeigte gc an der OV-17-Säule neben Spuren von Butyrospermolacetat zwei Komponenten, die anhand ihrer RRT (1,56 bzw. 1,26, bezogen auf ß-Sitosterin) keinem bekannten Triterpenacetat zugeordnet werden konnten.

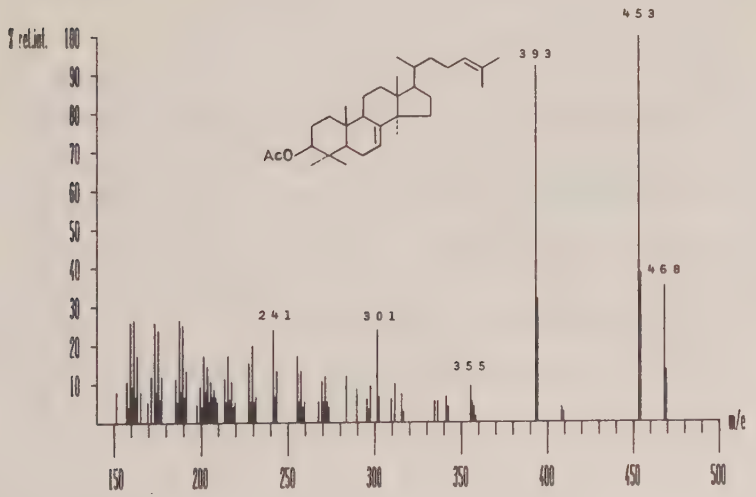


Abbildung 10 : Massenspektrum von Lanosta-7,24-dien-3ß-ol-acetat

Das Massenspektrum der Komponente mit der RRT von 1,56 war in der Fragmentierung und - mit einer Ausnahme - auch in den relativen Intensitäten der einzelnen Spaltprodukte identisch mit Butyrospermolacetat (s. Tab.1,S. 43). Danach muß es sich bei dieser Verbindung ebenfalls um ein tetracyclisches Triterpenacetat mit einer aus acht C-Atomen bestehenden, Δ^{24}-ungesättigten Seitenkette handeln. Die abweichende relative Intensität tritt bei dem Fragment auf, das durch Abspaltung der Seitenkette unter Addition von zwei H-Atomen aus dem Ringsystem gebildet wird (m/e 355, s. Tab. 1,S. 43). Die Intensität dieses Peaks entspricht derjenigen von Lanostan-Triterpenen. Danach sollte es sich bei diesem Triterpen um das C-17-Isomere von Butyrospermol, d.h. um Lanosta-7,24-dien-3ß-ol handeln.

Die RRT dieser Verbindung, bezogen auf Cholesterin, wird von GIBBONS und Mitarb. (1973) für die SE-30-Säule angegeben. Die GC-Analyse an dieser Säule ergab für die vorliegende Verbindung eine mit Lanosta-7,24-dien-3ß-ol-acetat übereinstimmende RRT, so daß auch hiernach das Vorliegen von Lanosta-7,24-dien-3ß-ol-acetat wahrscheinlich ist. Wünschenswert wäre jedoch ein Vergleich mit dem Stereoisomeren Tirucalla-7,24-dienol, das von ITOH und Mitarb. (1976b) aus dem Samenöl von Thea sinensis isoliert worden ist. Dieser Triterpenalkohol gehört zur Tirucallan-Reihe, die tetracyclische Triterpene mit 17 α-ständiger Seitenkette und einem 20 S-C-Atom darstellen.

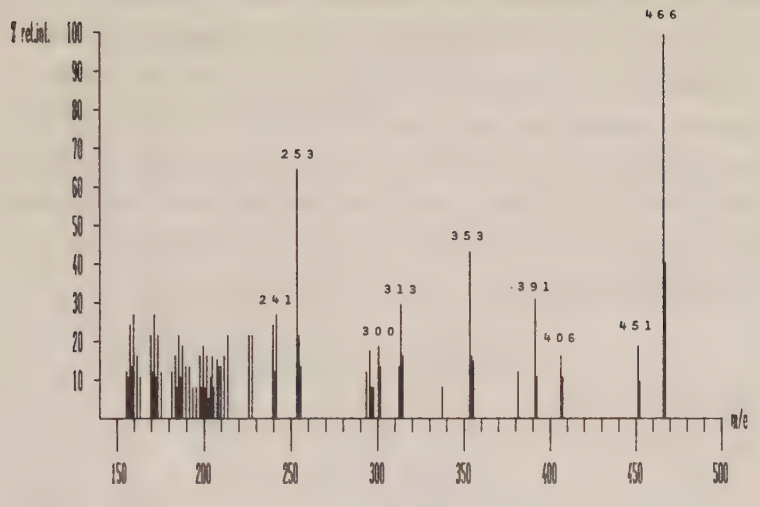


Abbildung 11 : Massenspektrum des nicht identifizierten tetracyclischen Triterpenacetats

Die massenspektrometrische Fragmentierung der Komponente mit der RRT von 1,26 ist in Tab. 1, S. 43 wiedergegeben. Aus dem Fragmentierungsmuster und dem Molekülpeak M^+: 466 geht hervor, daß es sich bei dieser Verbindung ebenfalls um ein tetracyclisches Triterpen mit einer aus acht C-Atomen bestehenden, Δ^{24}-ungesättigten Seitenkette handelt, das jedoch im Ringsystem eine zusätzliche Doppelbindung enthält. Über die Lage dieser Doppelbindung können jedoch keine Aussagen gemacht werden.

d) Cycloartenol und Lanosterol (Fraktion IV)

Die durch präparative DC gewonnene Fraktion IV, die hier in Höhe von Cycloartenol- und Lanosterolacetat erschien (hRf 78), trennte sich gc an der OV-17-Säule in zwei Komponenten auf (s. Abb. 4d,S. 24), die nach direktem Vergleich mit authentischem Cycloartenol- und Lanosterolacetat identisch waren (RRT bezogen auf ß-Sitosterin 1,28 bzw. 1,52; ITOH und Mitarb., 1974a; 1977b: 1,28 bzw. 1,52). Auch an der OV-101-Kapillarsäule stimmten die Retentionszeiten beider Verbindungen mit diesen Vergleichssubstanzen überein (RT 4,9 bzw. 5,6 Min.).

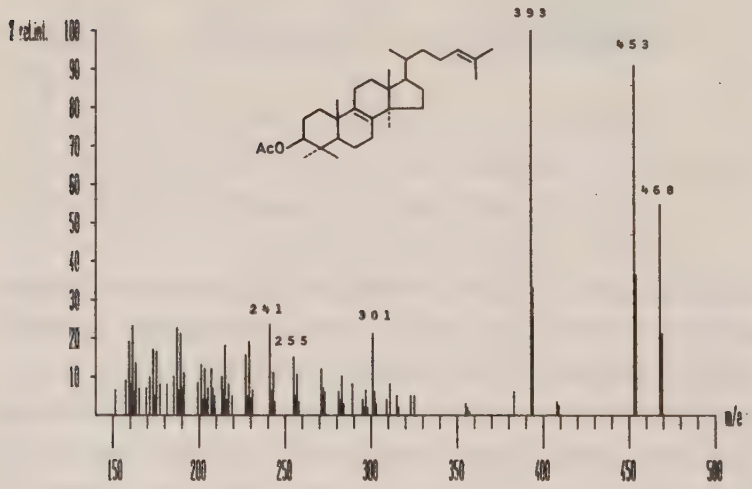


Abbildung 12 : Massenspektrum von Lanosterolacetat

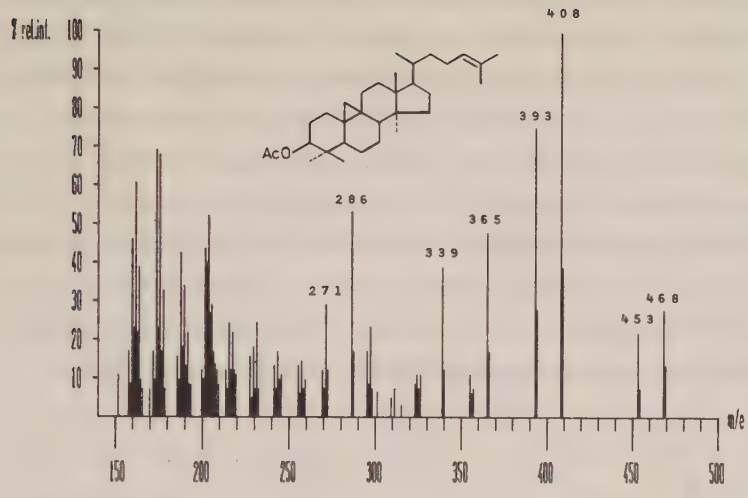


Abbildung 13 : Massenspektrum von Cycloartenolacetat

Die Massenspektren waren identisch mit den zum Vergleich aufgenommenen Spektren von Cycloartenol- und Lanosterolacetat (s. Abb. 12 u. 13). Die Fragmentierung der beiden Triterpenacetate verläuft analog wie beim bereits beschriebenen 24-Methylencycloartanolacetat bzw. 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat. Unterschiede treten lediglich in der Abspaltung der Seitenkette aufgrund der hier vorliegenden Δ^{24}-Doppelbindung (dort $\Delta^{24\ (28)}$) auf. Die einzelnen Fragmente sind in Tab. 1, S. 43 wiedergegeben (s. auch GOULSTON und Mitarb., 1975; ITOH und Mitarb., 1978a; NIELSEN und Mitarb., 1979).
Nach den dc, gc und gc/ms Untersuchungen handelt es sich somit um Cycloartenolacetat und Lanosterolacetat.

e) Pentacyclische Triterpene (Fraktion V)

Fraktion V, die bereits im DC-System V zwei unvollständig getrennte Flecken aufwies (s. Abb. 3), zeigte im GC an der OV-17-Säule neben aliphatischen Alkoholacetaten fünf Peaks mit den RRT von 1,29, 1,35, 1,47, 1,56 und 1,81, bezogen auf ß-Sitosterin (s. Abb. 4e). Eine Zuordnung zu bekannten Triterpenen anhand dieser RRT konnte nicht getroffen werden. Die beiden ersten Komponenten wurden auch auf der OV-101-Kapillarsäule nicht soweit getrennt, um ein in seinen Komponenten einheitliches und damit auswertbares Massenspektrum aufzunehmen. Dies war nur bei den anderen drei Verbindungen der Fall.

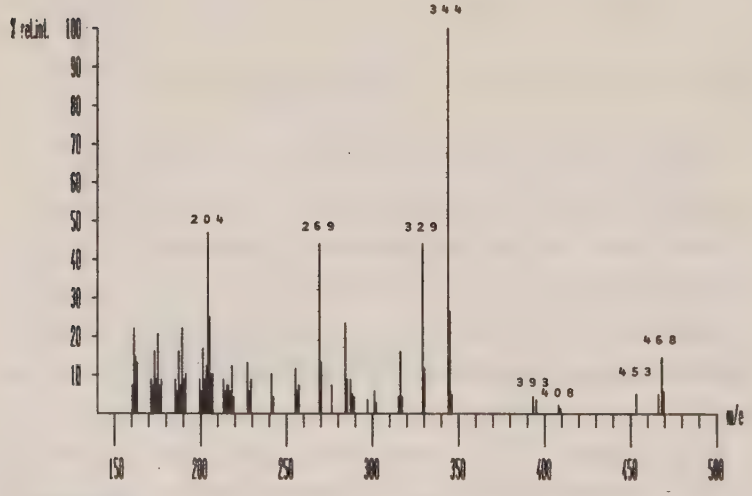


Abbildung 14 : Massenspektrum des Triterpenacetats mit der RRT von 1,47 (Taraxeren-Derivat)

Das Massenspektrum der Komponente mit der RRT von 1,47 zeigte einen Molekülpeak bei M^+: 468, was für das Vorliegen eines Triterpenacetats mit einer Doppelbindung spricht. Da abgesehen von der Abspaltung einer Methylgruppe, einer Acetatgruppe sowie beider Gruppen im Bereich vom Molekülpeak keine weiteren charakteristischen Spaltprodukte auftreten (s. Abb. 14 u. Tab. 2), sollte es sich um ein pentacyclisches Triterpenacetat handeln. Desweiteren treten keine Retro-Diels-Alder-Fragmente auf, die auf eine Δ^{12}-Doppelbindung hindeuten, so daß das Vorliegen eines Triterpens vom α- bzw. ß-Amyrintyp (Δ^{12}-Oleanan- bzw. Δ^{12}-Ursan-Typ) ausgeschlossen werden kann. Desgleichen finden sich keine Fragmente mit der Massendifferenz 43, so daß auch keine Isopropylgruppe im Molekül (Lupan-Typ) anwesend ist. Basispeak ist ein Fragment mit der Masse m/e 344, von dem durch Abspaltung einer Methylgruppe, der Acetatgruppe und beider Gruppen die Fragmente m/e 329, 284 bzw. 269 abgeleitet werden können. Das bedeutet, daß die Doppelbindung im Ring D lokalisiert sein muß, da andernfalls kein Fragment dieser Größenordnung entstehen kann, das noch eine Acetatfunktion enthält. Die Entstehung des charakteristischen Fragments m/e 204 dürfte durch eine Bindungsspaltung im Ring C zwischen C-11 und C-12 sowie C-8 und C-14 entstanden sein, für das BUDZIKIEWICZ und Mitarb. (1963) die in Abb. 15 wiedergegebenen Fragmente postulieren. Die Abspaltung einer Methylgruppe von diesem Fragment führt zum Spaltprodukt m/e 189.
Die Fragmentierung des vorliegenden Triterpenacetats zeigt danach die typischen Fragmente, die BUDZIKIEWICZ und Mitarb. (1963) für Δ^{14}-Taraxeren-Derivate formulieren. Ein daraufhin

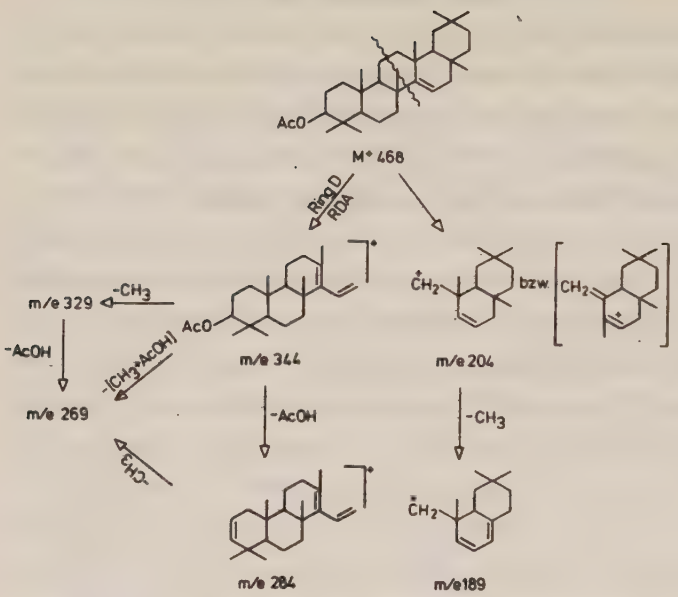


Abbildung 15 : Bildung der charakteristischen Fragmente des Δ^{14}-Taraxerenderivates

vorgenommener direkter Vergleich des Massenspektrums mit dem von Taraxerylacetat ergab, daß beide Verbindungen gleiche Fragmente, jedoch mit unterschiedlicher Intensität liefern. Auch gc lag keine Übereinstimmung mit dieser Verbindung vor.
Die Untersuchungen lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß es sich bei der vorliegenden Verbindung um ein pentacyclisches Triterpen mit einer Δ^{14}-Doppelbindung handelt, wahrscheinlich um ein Isomeres von Taraxerol.

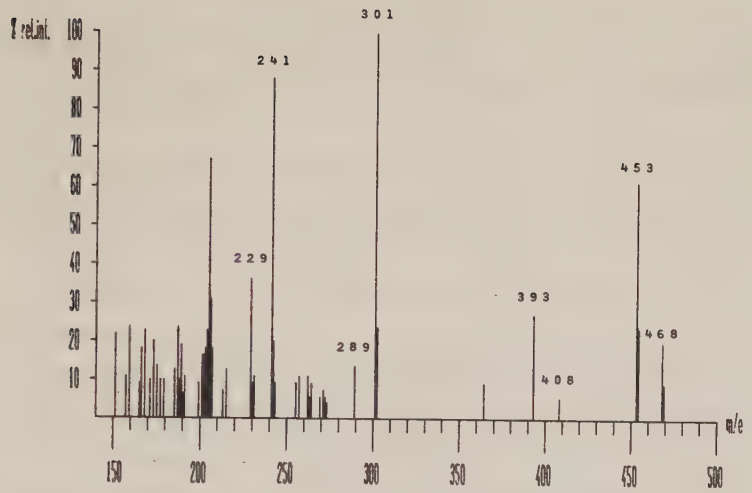


Abbildung 16 : Massenspektrum des Triterpenacetats mit der RRT von 1,56 (Arboren-Derivat)

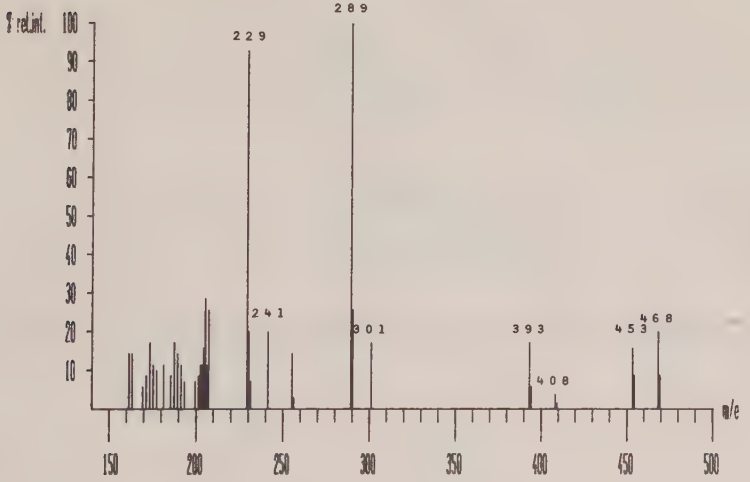


Abbildung 17 : Massenspektrum des Triterpenacetats mit der RRT von 1,81 (Baueren-Derivat)

Bei den Komponenten mit den RRT von 1,56 und 1,81 handelt es sich aufgrund der Molpeaks (M^+: 468) und des Fragmentierungsmusters ebenfalls um pentacyclische Triterpenacetate mit einer Doppelbindung im Molekül (S. Abb. 16 u. 17 bzw. Tab. 2). Die charakteristischen Fragmente m/e 301, 289, 241, 229, 205 und 204 bei beiden Verbindungen lassen sich am besten unter Annahme einer Arboren- bzw. Baueren-Struktur erklären, die jeweils Methylgruppen in Stellung 13 und 14 gebunden haben. Die Anwesenheit dieser Methylgruppen beeinflußt charakteristisch das Fragmentierungsmuster, wobei die Position der Doppelbindung in diesem Ringsystem (Δ^7, $\Delta^{9\,(11)}$) lediglich die relative Intensität einzelner Fragmente beeinflußt (BUDZIKIEWICZ und Mitarb., 1963). Wegen fehlender Vergleichsspektren konnte eine weitere Identifizierung dieser Triterpene nicht durchgeführt werden.

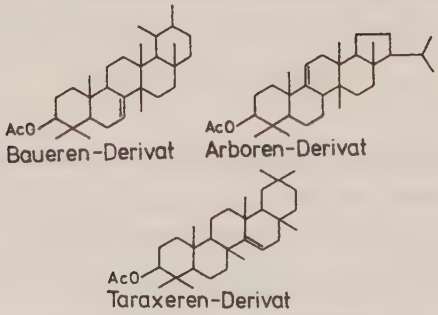


Abbildung 18 : Strukturformeln pentacyclischer Triterpenacetate

Tabelle 1 : Ergebnisse der MS-Untersuchungen der acetylierten tetracyclischen Triterpene

Fragmentierung	24-Methylen-cycloartanol-Ac		Cycloartenol-Ac		24-Methylen-lanost-8-en-3β-ol-Ac		Lanosterin-Ac		Butyrospermol-Ac		Lanosta-7,24-dien-3β-ol-Ac		tetracycl. Triterpen-Ac	
	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.
M^+ [Molekülion]	482	(18%)	468	(28%)	482	(49%)	468	(55%)	468	(36%)	468	(35%)	466	(100%)
$M^+ - CH_3$	467	(16%)	453	(22%)	467	(99%)	453	(91%)	453	(100%)	453	(100%)	451	(19%)
M^+ -AcOH	422	(100%)	408	(100%)	422	(11%)	408	(6%)	408	(5%)	408	(4%)	406	(16%)
$M^+ - [CH_3+AcOH]$	407	(71%)	393	(75%)	407	(100%)	393	(100%)	393	(95%)	393	(92%)	391	(31%)
$M^+ - [CH_3+84(C_{23}-C_{27}+1H)]$	383	(7%)	-	-	383	(16%)	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [AcOH+43(?)]$	379	(63%)	365	(48%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [SK(=Seitenkette)]$	357	(7%)	357	(7%)	357	(5%)	357	(1%)	357	(5%)	357	(4%)	355	(15%)
$M^+ - [SK+2H]$	355	(7%)	355	(11%)	355	(9%)	355	(3%)	355	(24%)	355	(9%)	353	(43%)
$M^+ - [AcOH+69(C_2-C_4)]$	353	(21%)	339	(39%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [SK+42(C_{15}-C_{17})]$	315	(5%)	315	(3%)	315	(10%)	315	(5%)	315	(8%)	315	(7%)	313	(30%)
$M^+ - [SK+42+CH_2(\text{von } C_{32})]$	301	(18%)	301	(7%)	301	(50%)	301	(21%)	301	(22%)	301	(24%)	-	-
$M^+ - [Ring\ A]$	300	(42%)	286	(53%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [SK+AcOH]$	297	(33%)	297	(24%)	297	(10%)	297	(7%)	297	(11%)	297	(9%)	295	(8%)
$M^+ - [SK+AcOH+2H]$	295	(21%)	295	(17%)	295	(8%)	295	(4%)	295	(12%)	295	(6%)	293	(12%)
$M^+ - [Ring\ A+CH_3]$	285	(20%)	271	(29%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [SK+42+AcOH]$	255	(21%)	255	(13%)	255	(31%)	255	(15%)	255	(20%)	255	(17%)	253	(65%)
$M^+ - [SK+42+CH_2+AcOH]$	241	(25%)	241	(13%)	241	(73%)	241	(24%)	241	(24%)	241	(24%)	239	(24%)
$M^+ - [Ring\ A+SK]$	175	(80%)	175	(67%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 2 : Ergebnisse der MS-Untersuchungen der acetylierten pentacyclischen Triterpene (Fraktion V)

	RRT 1,47		RRT 1,56		RRT 1,81	
M^+	468	(15 %)	468	(20 %)	468	(20 %)
$M^+ - CH_3$	453	(5 %)	453	(62 %)	453	(16 %)
$M^+ - AcOH$	408	(2 %)	408	(6 %)	408	(4 %)
$M^+ - (AcOH+CH_3)$	393	(4 %)	393	(27 %)	393	(17 %)
	344	(100 %)	301	(100 %)	301	(17 %)
	329	(44 %)				
	316	(16 %)				
	284	(24 %)	289	(14 %)	289	(100 %)
	269	(44 %)				
	255	(12 %)	255	(9 %)	255	(14 %)
	241	(10 %)	241	(88 %)	241	(20 %)
	227	(13 %)	229	(36 %)	229	(92 %)
	218	(13 %)				
	205	(25 %)	205	(67 %)	205	(29 %)
	204	(47 %)	204	(23 %)	204	(16 %)
	189	(22 %)	189	(19 %)	189	(14 %)

3.2. Die frei vorliegenden Triterpene

3.2.1. Isolierung

Neben den veresterten Triterpenen wurden in den Blättern von S. albus auch frei vorliegende Triterpene dc nachgewiesen (s. Abb. 1, S. 14). Zu ihrer Isolierung wurde die bei der Trockensäulenchromatographie erhaltene Fraktion J (s. Tab. 26,

S. 186) herangezogen und sc an Kieselgel aufgetrennt (s. Exp. Teil,S. 188). Neben Fraktionen, die u.a. Methylsterine und Sterine enthielten, wurden hierbei 102 mg dc reine Triterpene gewonnen. Die wachsartige Konsistenz der Fraktion deutete jedoch auf die gleichzeitige Anwesenheit von aliphatischen Alkoholen hin, was durch GC-Auftrennung (OV-17-Säule) bestätigt wurde. Ihr Anteil an der Fraktion betrug danach 69 %. Aliphatische Alkohole sind in der Lage, mit Harnstoff kristalline Additionsverbindungen einzugehen, wozu cyclische Verbindungen nicht fähig sind (vgl. SCHLENK, 1949). Über diese Harnstoffadduktbildung wurden die aliphatischen Alkohole von den Triterpenen abgetrennt (s. Exp. Teil,S. 192). Danach lagen 30 mg Triterpene vor.

3.2.2. Identifizierung

Zur Identifizierung wurden die freien Triterpene acetyliert und die Acetate wie bei den aus der Esterfraktion gewonnenen Triterpenen beschrieben an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgel-Platten präparativ aufgetrennt (s. Exp. Teil, S. 189). Auch hier wurden fünf Fraktionen erhalten, deren Zusammensetzungen analog durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab. 3,S. 46 wiedergegeben. Danach kommen 24-Methylencycloartanol, Lupeol und 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol in den Blättern auch frei vor (Fraktion I). Fraktion II enthielt Butyrospermol, das frei jedoch nur in Spuren auftritt. Gleiches trifft für Lanosta-7,24-dien-3ß-ol und das nicht weiter identifizierte tetracyclische C_{30}-Triterpen zu (Fraktion III). Auch Cycloartenol

Tabelle 3 : Die frei vorliegenden Triterpene der Blätter von S. albus sowie Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der frei und verestert vorliegenden Triterpene

Fraktion*	Triterpene (als Acetate)	RRT **	verestert 0,02 % v.TG*** Zusammensetzg. in %	frei 0,01 % v.TG Zusammensetzg. in %
I	24-Methylencycloartanol	1,69	4	2
	Lupeol	1,57	< 1	1
	24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol	1,42	1	2
II	Butyrospermol	1,38	14	< 0,1
III	Lanosta-7,24-dien-3ß-ol	1,56	5	< 0,1
	nicht identif. tetracycl. C_{30}-Triterpen	1,26	1	< 0,1
IV	Cycloartenol	1,52	55	3
	Lanosterol	1,28	15	3
V	nicht identif. pentacycl. Triterpen	1,29	< 1	-
	nicht identif. pentacycl. Triterpen	1,35	< 1	23
	ß-Amyrin	1,37	?	
	Taraxeren-Derivat	1,47	1	-
	α-Amyrin	1,52	-	15
	28-Nor-Urs-12-en-3ß-ol oder 28-Nor-Olean-12-en-3ß-ol	1,52	-	51
	Arboren-Derivat	1,56	1	-
	Baueren-Derivat	1,81	< 1	-

* s. Abb. 3,S. 20
** OV-17-Säule, RRT bezogen auf ß-Sitosterin
*** präparative Ausbeute bezogen auf das Blatt-Trockengewicht

und Lanosterol sind mit jeweils nur ca. 3 % an der Zusammensetzung der freien Triterpene beteiligt, während sie bei den veresterten Triterpenen 55 bzw. 15 % der Fraktion bilden.
Die Hauptmenge der frei vorliegenden Triterpene wird von pentacyclischen Verbindungen gebildet (Fraktion V, ca. 89 %). Im Gaschromatogramm der OV-17-Säule erschienen lediglich zwei Peaks. Die Fraktion unterschied sich damit in der Zusammensetzung deutlich von der entsprechenden Fraktion aus den veresterten Triterpenen (vgl. Abb. 19 und Abb. 4e, S. 24).
Die Retentionszeiten der beiden Peaks stimmten nach direktem

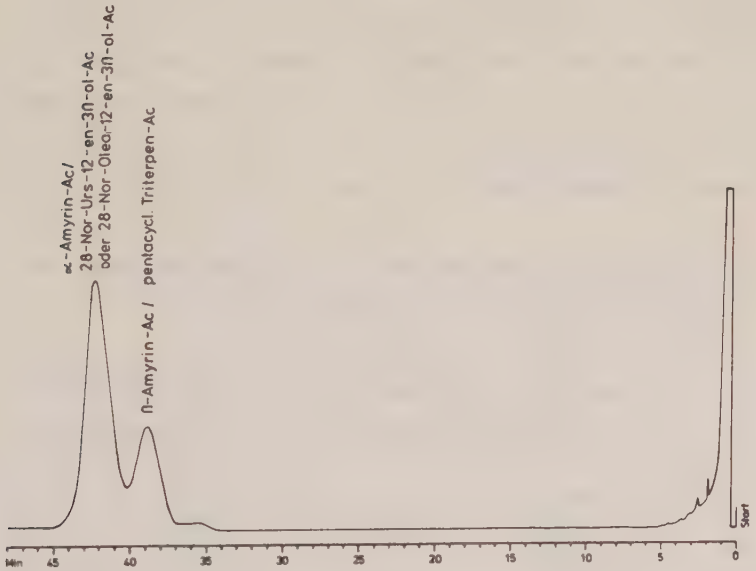


Abbildung 19 : GC der frei vorliegenden pentacyclischen Triterpene (Fraktion V)
(Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

Vergleich mit ß- und α-Amyrinacetat überein. An der SE-30-Säule zeigte die Fraktion jedoch drei Komponenten, von denen zwei wiederum mit α- und ß-Amyrinacetat identisch waren. Der zwischen diesen Verbindungen auftretende Hauptpeak (RRT 1,52, s. Tab. 4) konnte keiner der zur Verfügung stehenden Vergleichssubstanzen zugeordnet werden. Die GC-Trennung an der QF-1-Säule ergab, daß der an den beiden anderen Säulen mit ß-Amyrinacetat übereinstimmende Peak im Hauptanteil nicht von diesem, sondern von einem Triterpen mit kleinerer Retentionszeit gebildet wird. ß-Amyrinacetat erschien an der QF-1-Säule zwischen dieser Verbindung und der unbekannten Hauptkomponente der Fraktion (s. Tab. 4). Seine gleichzeitige Anwesenheit in der Fraktion gab sich lediglich durch einen unsymmetrischen Peakverlauf und die nicht erfolgte Basistrennung der beiden unbekannten Verbindungen zu erkennen. Das Vorkommen von α-Amyrinacetat wurde auch an dieser Säule bestätigt.

Tabelle 4 : GC-Trennung der frei vorliegenden pentacyclischen Triterpene (Fraktion V)

pentacycl. Triterpenacetate	OV-17*	SE-30**	QF-1**
unbekanntes Triterpen	1,37	1,46	1,69
ß-Amyrin	1,37	1,46	1,76
unbekanntes Triterpen	1,52	1,52	1,88
α-Amyrin	1,52	1,60	1,99

* RRT bezogen auf ß-Sitosterin
** RRT bezogen auf Cholesterinacetat

Nach der GC-Untersuchung liegen in Fraktion V α-Amyrinacetat, zwei unbekannte Triterpenacetate und wahrscheinlich ß-Amyrinacetat vor.

Die anschließende GC/MS-Untersuchung an der OV-101-Kapillarsäule lieferte im Gaschromatogramm drei gut getrennte Peaks, von denen einer dieselbe Retentionszeit wie α-Amyrinacetat aufwies (RT 5,2 Min.). Das Massenspektrum (s. Abb. 20)

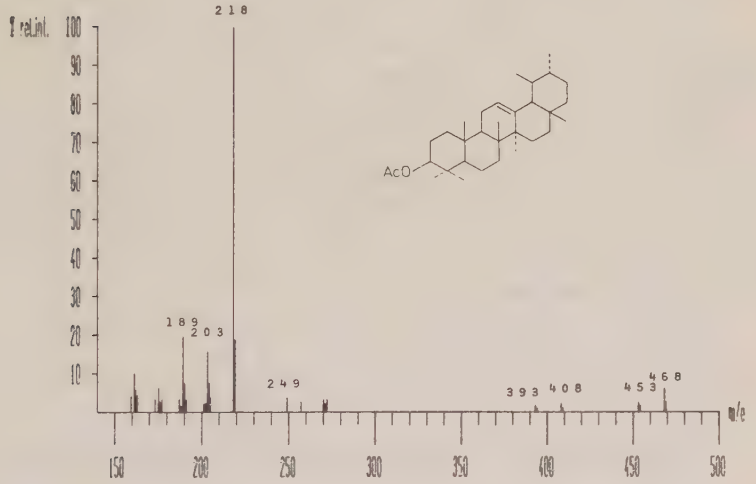


Abbildung 20 : Massenspektrum von α-Amyrinacetat

stimmte sowohl in der Fragmentierung als auch in den relativen Intensitäten der einzelnen Fragmentpeaks mit dem unmittelbar danach aufgenommenen Spektrum der Vergleichssubstanz überein. Neben dem Molpeak [M^+ 468 (6 %)] und den durch Abspaltung einer Methylgruppe sowie der Acetat- und einer Methyl-

gruppe entstandenen Fragmenten m/e 453 (2,5 %) und 393 (1,5 %) enthielt das Spektrum die für Δ^{12}-Verbindungen vom Ursan- und Oleanan-Typ charakteristischen Fragmente m/e 249 (4 %), 218 (100 %), 203 (16 %) und 189 (20 %) (s. DJERASSI und Mitarb., 1962; BUDZIKIEWICZ und Mitarb., 1963). Die Fragmente entstehen nach einer Retro-Diels-Alder-Spaltung, bedingt durch die Δ^{12}-Doppelbindung (s. auch die Fragmentierung der Ursolsäure, S. 115).

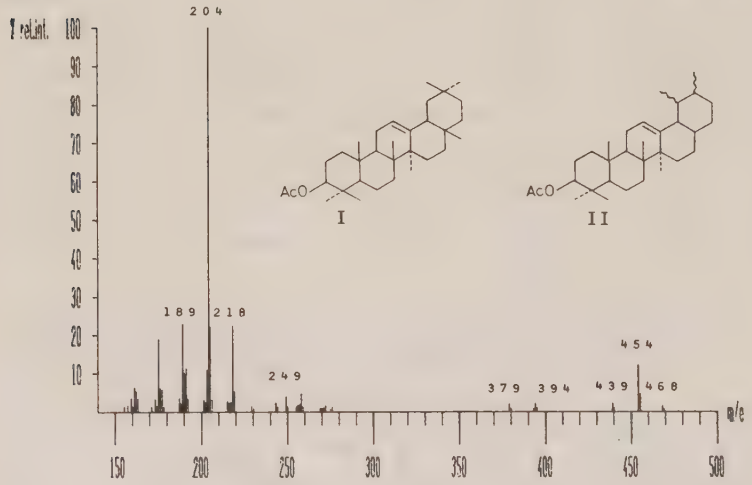


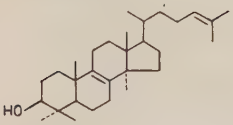
Abbildung 21 : Massenspektrum von ß-Amyrinacetat (I) und 28-Nor-Urs-12-en-3ß-ol-acetat (oder 28-Nor-Olean-12-en-3ß-ol-acetat) (II)

Der Hauptpeak mit der RT von 4,9 Min. zeigte im Massenspektrum die Fragmentierung von zwei Komponenten mit den Molpeaks

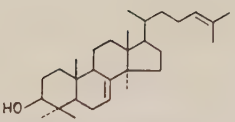
M^+ 468 und 454. Bei der Verbindung mit dem Molpeak 468 muß es sich aufgrund der Retentionszeit und der Fragmentierung um ß-Amyrinacetat handeln, von dem die Fragmente m/e 453 ($M^+ -CH_3$) und 393 [M^+-(CH_3 + AcOH)] sowie die durch die Δ^{12}-Doppelbindung entstehenden Fragmente m/e 249, 218, 203 und 189 stammen.

Die Fragmente m/e 439 und m/e 379 lassen sich durch Abspaltung einer Methylgruppe ($M^+ -CH_3$) sowie einer Methylgruppe und der Acetatgruppe [M^+-(CH_3 + AcOH)] von der Verbindung mit dem Molpeak 454 ableiten. Das Hauptfragment m/e 204 wird durch eine Retro-Diels-Alder-Spaltung, bedingt durch eine Δ^{12}-Doppelbindung, gebildet (s. COMEAU u. BRAUN, 1974). Durch Abspaltung einer Acetatgruppe von dem Fragment m/e 249 entsteht das Spaltprodukt m/e 189 (s. auch Abb. 7, S. 29). Aufgrund dieser Fragmente handelt es sich hier um ein pentacyclisches Triterpenacetat mit einer Δ^{12}-Doppelbindung, dem eine Methylgruppe im Ring D oder E fehlt. Da die Blätter von S. albus α- und ß-Amyrin sowie die sich davon biosynthetisch ableitende Ursol- bzw. Oleanolsäure führen (s. S. 113ff) dürfte es sich bei dieser Verbindung entweder um 28-Nor-Urs-12-en-3ß-ol-acetat oder 28-Nor-Olean-12-en-3ß-ol-acetat handeln, das durch Decarboxylierung der entsprechenden Säure entsteht. Das Massenspektrum der dritten Verbindung konnte nicht interpretiert werden.

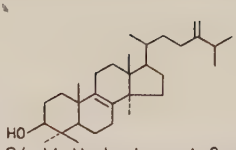
Lanostan-Typ



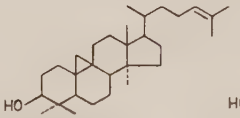
Lanosterol



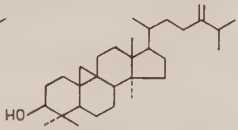
Lanosta-7,24-dien-3ß-ol



24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol

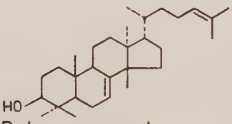


Cycloartenol



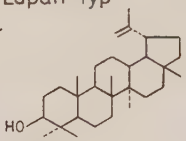
24-Methylencycloartanol

Euphan-Typ



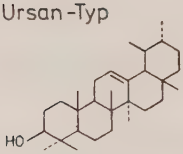
Butyrospermol

Lupan-Typ



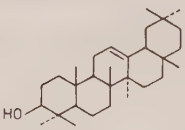
Lupeol

Ursan-Typ



α-Amyrin

Oleanan-Typ



ß-Amyrin

Abbildung 22 : Strukturformeln der identifizierten Triterpene

4. Die Methylsterine

4.1. Die verestert vorliegenden Methylsterine

4.1.1. Isolierung und Identifizierung durch DC- und GC-Analyse

Bei der Isolierung der Triterpene aus den Esterfraktionen F und G (s. Tab. 26, S. 186) fielen bei der sc Auftrennung des unverseifbaren Anteils neben den Triterpenen gleichzeitig Methylsterine an (s. Exp. Teil, S. 187). Nach präparativer DC der entsprechenden Fraktionen wurden 24,7 mg eines Kristallisats erhalten, das in den DC-Systemen I-IV einheitlich war und hier in Laufhöhe und Färbung mit Molybdatophosphorsäure (zuerst braun, dann violett) mit den Methylsterinen Gramisterol und Citrostadienol übereinstimmte (hRf 33, 5, 57 bzw. 34). Für die GC-Analyse wurde ein Teil des Kristallisats acetyliert und das nicht acetylierte und das acetylierte Kristallisat an einer OV-17-Säule aufgetrennt. Im GC erschienen jeweils fünf Peaks (s. Abb. 24), von denen vier im direkten Vergleich Lophenol, Obtusifoliol, Gramisterol und/oder Cycloeucalenol sowie Citrostadienol zugeordnet werden konnten. Aufgrund der RRT (frei: 0,73 bezogen auf ß-Sitosterin, Acetat: 1,11, bezogen auf Cholesterinacetat) könnte es sich beim fünften Peak um 31-Norlanost-8-en-3ß-ol handeln (Lit. frei: 0,70, JEONG und Mitarb., 1975b; Acetat: 1,11, ITOH und Mitarb., 1978a).

Die genannten Methylsterine unterscheiden sich sowohl in der Anzahl der Methylgruppen am Ringsystem als auch in der Anzahl und Lage der Doppelbindungen in dem Molekül (Strukturformeln s. Abb. 33, S. 66). Wie bei den Triterpenen sollte danach eine dc Auftrennung des Methylsteringemisches an mit

Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten möglich sein. Abbildung 23 zeigt die durchgeführte Trennung im DC-System V, in dem sich das acetylierte Methylsteringemisch in fünf Komponenten auftrennte. Von diesen konnten vier durch direkten Vergleich als Gramisterol-, Obtusifoliol- und/oder Cycloeucalenolacetat, Citrostadienol- sowie Lophenolacetat identifiziert werden. Damit wurden die Ergebnisse der GC-Analyse bestätigt.

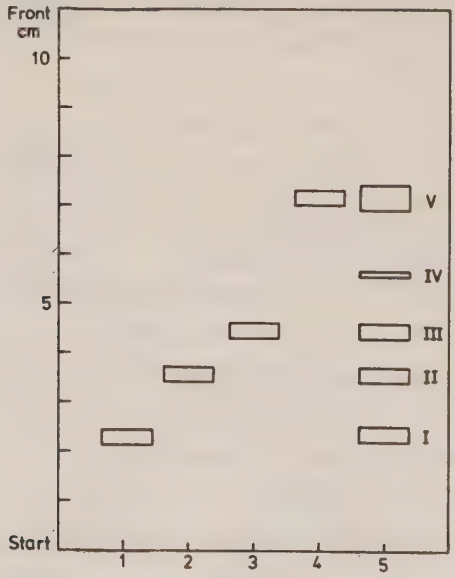


Abbildung 23 : DC der acetylierten Methylsterine (DC-System V)

1 : Gramisterolacetat

2 : Obtusifoliolacetat u. Cycloeucalenolacetat

3 : Citrostadienolacetat

4 : Lophenolacetat

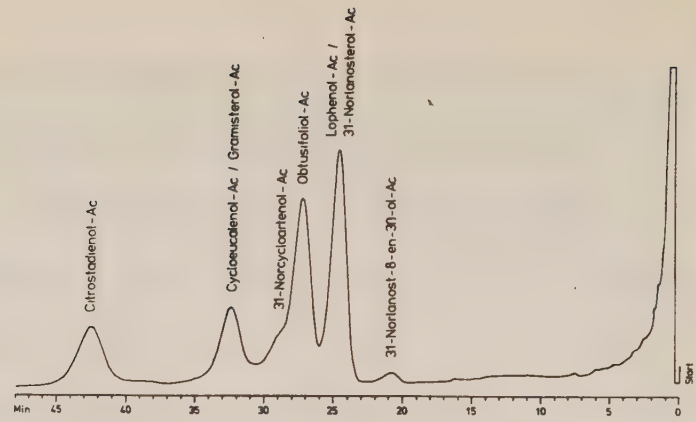
5 : Acetylierte Methylsterine der Schneebeerenblätter

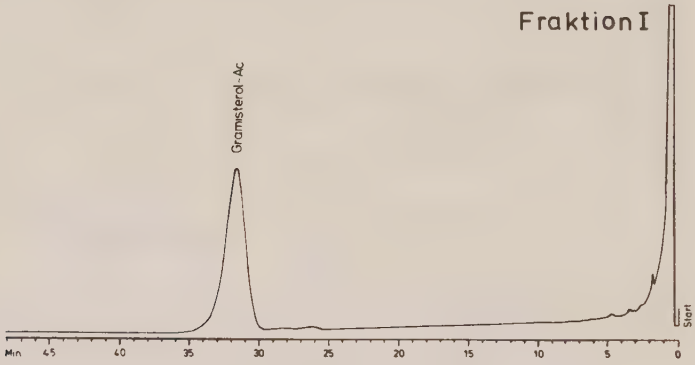
4.1.2. Präparative Auftrennung der Methylsterinacetate und Identifizierung von Gramisterol, Citrostadienol, Obtusifoliol, Cycloeucalenol, 31-Norlanosterol, 31-Norcycloartenol, 31-Norlanost-8-en-3ß-ol und Lophenol durch GC- und GC/MS-Analyse

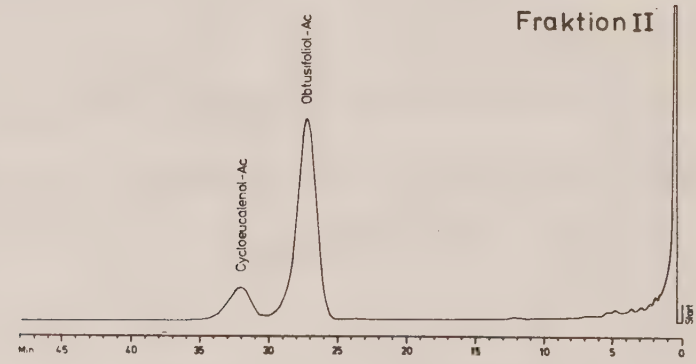
Zur weiteren Identifizierung der Methylsterine wurden 17 mg der Acetate an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelfolien im DC-System V in fünf Fraktionen getrennt (s. Abb. 23) und diese nach gc Untersuchung an der OV-17-Säule (s. Abb. 24) der GC/MS-Analyse an einer OV-101-Kapillarsäule zugeführt.

a) Gramisterol (= 24-Methylenlophenol) - Fraktion I

Fraktion I (2,7 mg) mit dem hRf-Wert 22 zeigte im GC nur einen Peak, der mit Gramisterolacetat identisch war (RRT s. Tab. 6). Das Massenspektrum (s. Abb. 25) zeigte die für Gramisterolacetat charakteristischen Fragmente (vgl. WILLIAMS und Mitarb., 1967; NAGASAMPAGI und Mitarb., 1971; ITOH und Mitarb., 1978a; 1978b). Die Fragmentierung verläuft hier ähnlich wie bei 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol-acetat (s. S. 30ff). Es fehlen jedoch die durch die Methylgruppe an C-14 bedingten Fragmente. Der Basispeak wird von dem Fragment m/e 327 gebildet, das nach Abspaltung der Seitenkette und zweier H-Atome entsteht. Dieses ist typisch für Δ^7-Sterine mit einer ungesättigten Seitenkette (vgl. auch BERGMAN und Mitarb., 1965; KNIGHTS, 1967; ITOH und Mitarb., 1973). Die Fragmentierung ist in Tabelle 6,S. 64 wiedergegeben.


Citrostadienol-Ac
Cycloeucalenol-Ac / Gramisterol-Ac
31-Norcycloartenol-Ac
Obtusifoliol-Ac
Lophenol-Ac / 31-Norlanosterol-Ac
31-Norlanost-8-en-3β-ol-Ac
Start
Min 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0


Fraktion I
Gramisterol-Ac
Start
Min 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0


Fraktion II
Cycloeucalenol-Ac
Obtusifoliol-Ac
Start
Min 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0

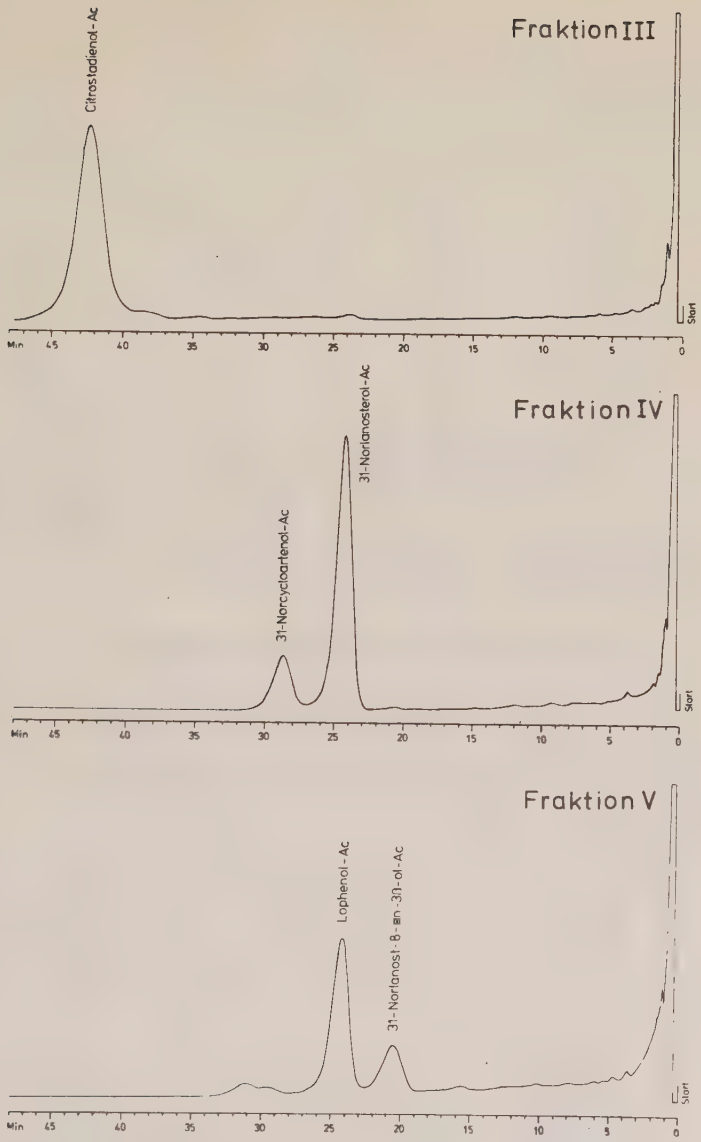


Abbildung 24 : Gaschromatogramme der isolierten Methylsterinfraktion sowie der Teilfraktionen I-V (Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

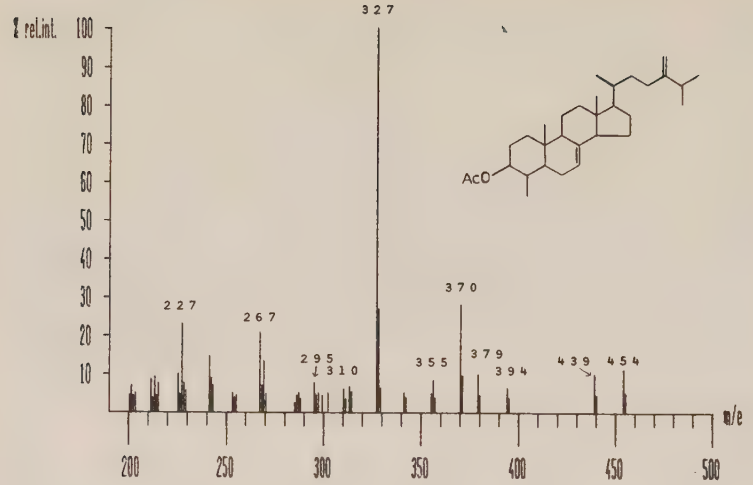


Abbildung 25 : Massenspektrum von Gramisterolacetat

b) Obtusifoliol und Cycloeucalenol - Fraktion II

Fraktion II (2,6 mg; hRf 32) trennte sich an der OV-17-Säule in zwei Komponenten auf, die nach direktem Vergleich mit Obtusifoliol- und Cycloeucalenolacetat identisch waren (RRT 1,23 bzw. 1,46, s. Tab. 6).

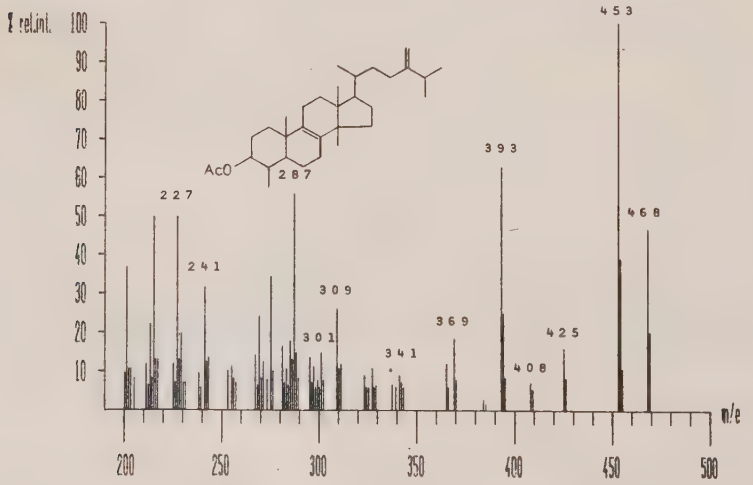


Abbildung 26 : Massenspektrum von Obtusifoliolacetat

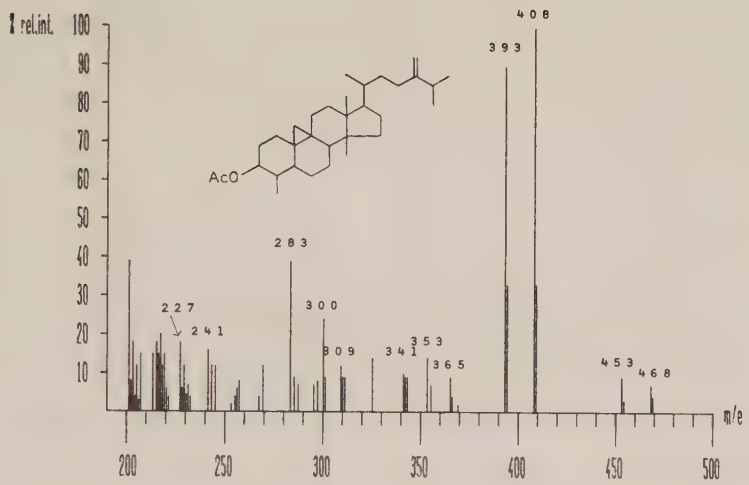


Abbildung 27 : Massenspektrum von Cycloeucalenolacetat

Die Massenspektren der beiden Verbindungen (s. Abb. 26 u. 27) waren identisch mit denjenigen der authentischen Vergleichssubstanzen. Die Fragmentierung verläuft hier ähnlich wie bei 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol- bzw. 24-Methylencycloartanolacetat (s. S. 30 bzw. 25, vgl. auch GOAD und Mitarb., 1967; NAGASAMPAGI und Mitarb., 1971; ITOH und Mitarb., 1978b). Die charakteristischen Fragmentierungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

c) Citrostadienol (= 24-Äthylidenlophenol) - Fraktion III

Die durch präparative DC erhaltene Fraktion (3 mg), die mit dem hRf-Wert 40 die gleiche Laufhöhe wie Citrostadienolacetat hatte, lieferte auch im GC nur einen Peak, dessen Retentionszeit mit Citrostadienolacetat identisch war. Das Massenspektrum

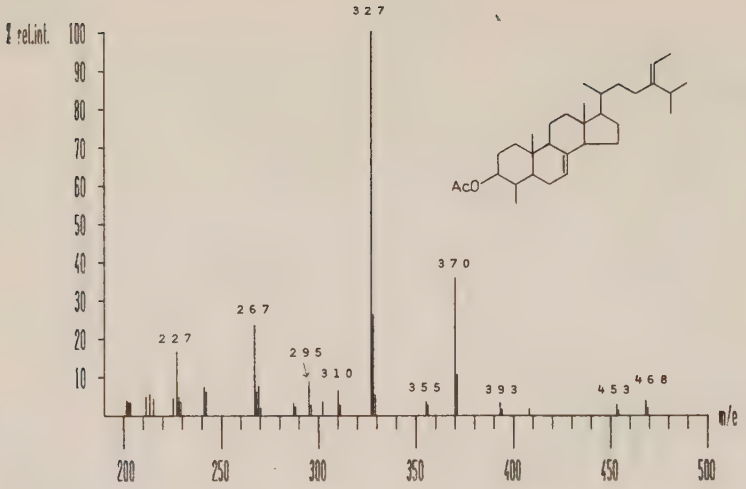


Abbildung 28 : Massenspektrum von Citrostadienolacetat

(s. Abb. 28) zeigte dieselbe Fragmentierung wie dasjenige der Vergleichssubstanz (vgl. auch WILLIAMS und Mitarb., 1967; NAGASAMPAGI und Mitarb., 1971; ITOH und Mitarb., 1978b). Die Fragmentierung ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

d) 31-Norlanosterol und 31-Norcycloartenol - Fraktion IV

Die nur in geringer Menge anfallende Fraktion IV (0,8 mg; hRf 51) lieferte im GC zwei Peaks (RRT bezogen auf ß-Sitosterin 1,10 bzw. 1,31 und bezogen auf Cholesterinacetat 1,32 bzw. 1,57). Die beiden letzten Werte stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten für 31-Norlanosterolacetat und 31-Norcycloartenolacetat überein (ITOH und Mitarb., 1978a: 1,33 bzw. 1,57).

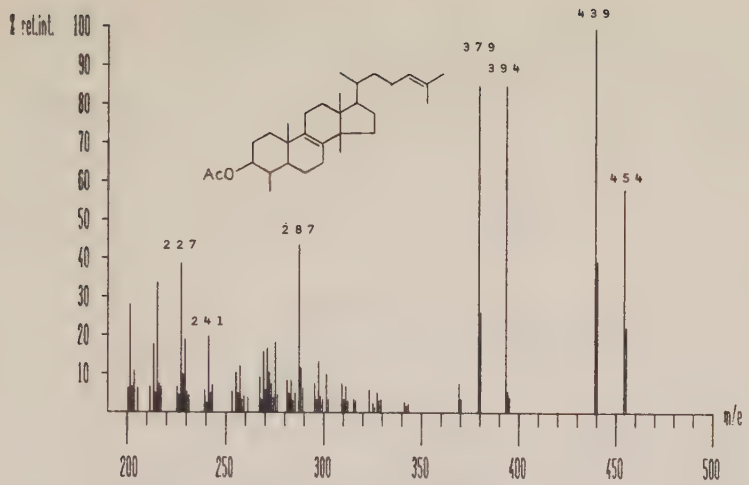


Abbildung 29 : Massenspektrum von 31-Norlanosterolacetat

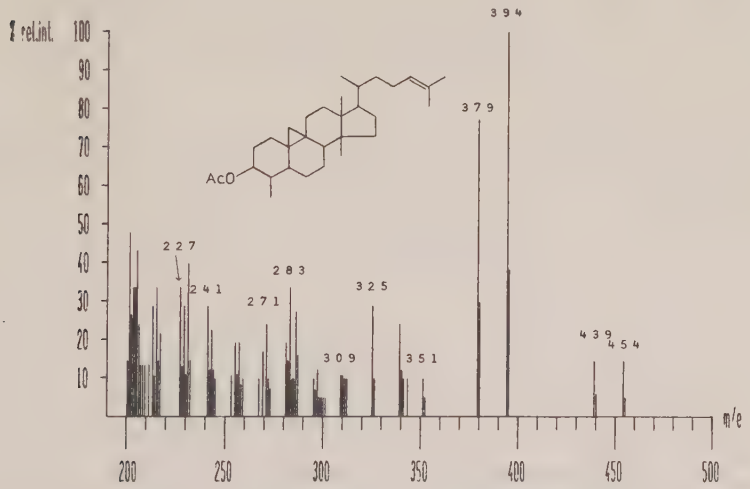


Abbildung 30 : Massenspektrum von 31-Norcycloartenolacetat

Die Massenspektren (s. Abb. 29 u. 30) entsprachen denjenigen dieser Verbindungen (AYENGAR u. RANGASWAMI, 1967; REES und Mitarb., 1968a; ITOH und Mitarb., 1978a; 1978b). Die Fragmentierung verläuft hier ähnlich wie bereits für Lanosterol- bzw. Cycloartenolacetat diskutiert wurde (s. S. 37) und ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

e) 31-Norlanost-8-en-3ß-ol und Lophenol - Fraktion V

Die unpolarste Fraktion (4,4 mg; hRf 65) lieferte einen im direkten Vergleich mit Lophenolacetat übereinstimmenden Hauptpeak (RRT 1,10, s. Tab. 6) und einen Peak mit der auf ß-Sitosterin bezogenen RRT von 0,94, bzw. auf Cholesterinacetat bezogenen RRT von 1,11, die für das Vorliegen von 31-Norlanost-8-en-3ß-ol-acetat sprechen (ITOH und Mitarb., 1978a; 1978b: RRT bezogen auf Cholesterinacetat 1,11).

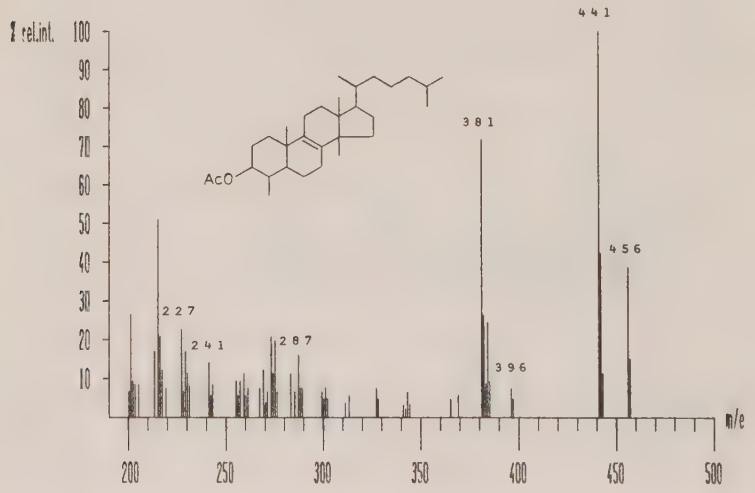


Abbildung 31 : Massenspektrum von 31-Norlanost-8-en-3ß-ol-acetat

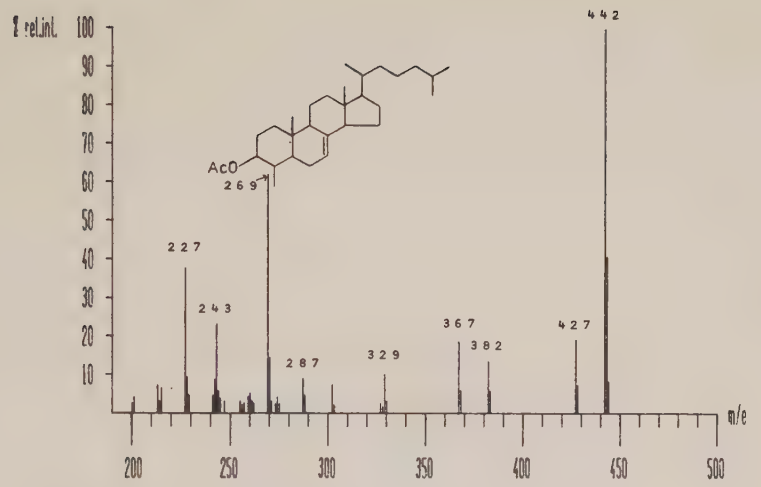


Abbildung 32 : Massenspektrum von Lophenolacetat

Die Identität der beiden Komponenten mit diesen Verbindungen wurde durch ihre Massenspektren bestätigt (s. Abb. 31 u. 32; vgl. auch ITOH und Mitarb., 1978a; 1978b). Die Fragmentierungen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Bei der Auftrennung der Methylsterinacetate an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelfolien wurden die geringen Polaritätsunterschiede zwischen den einzelnen Substanzen ausgenutzt, die sich vor allem aus der unterschiedlichen Lage der Doppelbindungen in der Seitenkette und im Ringsystem ergeben (vgl. auch FISCHER u. HERTEL, 1968). In Abbildung 33 sind die Strukturformeln der isolierten Methylsterinacetate in Abhängigkeit von ihrem Laufverhalten dargestellt. Hierbei

Tabelle 5 : Ergebnisse der MS-Untersuchungen der Methylsterinacetate

Fragmentierung	Gramisterol-Ac		Citrostadienol-Ac		Lophenol-Ac		Obtusifoliol-Ac		31-Norlanosterol-Ac		31-Norlanost-8-en-3ß-ol-Ac		Cycloeucalenol-Ac		31-Norcycloartenol-Ac	
	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.
M^+[Molekülion]	454	(11%)	468	(4%)	442	(100%)	468	(47%)	454	(58%)	456	(39%)	468	(7%)	454	(14%)
M^+-CH_3	439	(10%)	453	(3%)	427	(19%)	453	(100%)	439	(100%)	441	(100%)	453	(9%)	439	(14%)
M^+-AcOH	394	(6%)	408	(2%)	382	(13%)	408	(7%)	394	(5%)	396	(7%)	408	(100%)	394	(100%)
$M^+-[CH_3+AcOH]$	379	(10%)	393	(3%)	367	(19%)	393	(63%)	379	(85%)	381	(71%)	393	(90%)	379	(77%)
M^+-[Teil d.SK]	370	(28%)	370	(36%)	-	-	384	(2%)	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+-[CH_3+$ Teil d.SK]	355	(5%)	355	(4%)	-	-	369	(18%)	-	-	-	-	369	(2%)	-	-
M^+-[AcOH+43(?)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	365	(9%)	351	(10%)
M^+-[SK]	329	(6%)	329	(5%)	329	(10%)	343	(6%)	343	(2%)	343	(7%)	343	(9%)	343	(9%)
M^+-[SK+2H]	327	(100%)	327	(100%)	327	(2%)	341	(9%)	341	(3%)	341	(3%)	341	(10%)	341	(9%)
M^+-[Teil d.SK+AcOH]$^+$	310	(6%)	310	(7%)	-	-	324	(6%)	324	(2%)	-	-	-	-	-	-
$M^+-[AcOH+55(C_2-C_4)]$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	353	(14%)	339	(24%)
$M^+-[$Teil d.SK+CH_3+AcOH]	295	(8%)	295	(9%)	-	-	309	(26%)	309	(7%)	-	-	309	(12%)	309	(10%)
$M^+-[SK+42(C_{15}-C_{17})]$	287	(5%)	287	(3%)	287	(9%)	301	(15%)	301	(10%)	301	(8%)	301	(9%)	301	(5%)
$M^+-[SK+42+CH_2$ (von C_{32})]	-	-	-	-	-	-	287	(56%)	287	(43%)	287	(16%)	287	(7%)	287	(16%)
M^+-[Ring A]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300	(24%)	286	(27%)
M^+-[SK+AcOH]	269	(13%)	269	(8%)	269	(62%)	283	(11%)	283	(8%)	283	(11%)	283	(39%)	283	(33%)
M^+-[SK+2H+AcOH]	267	(21%)	267	(24%)	-	-	281	(16%)	281	(8%)	-	-	-	-	281	(16%)
$M^+-[$Ring A+CH_3]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	285	(9%)	271	(24%)
M^+-[SK+42+AcOH]	227	(23%)	227	(17%)	227	(38%)	241	(31%)	241	(20%)	241	(14%)	241	(16%)	241	(29%)
$M^+-[SK+42+CH_2$+AcOH]	-	-	-	-	-	-	227	(50%)	227	(39%)	227	(23%)	227	(18%)	227	(33%)

wird deutlich, daß der Sättigungsgrad der Seitenkette und die Lage der Doppelbindung in der Seitenkette den größten Einfluß auf das Laufverhalten in diesem System ausüben. Die größte Laufhöhe haben die Verbindungen mit einer gesättigten Seitenkette, gefolgt von denen mit einer Δ^{24}-Doppelbindung. Die Verbindungen mit einer endständigen $\Delta^{24\ (28)}$-Doppelbindung werden am stärksten zurückgehalten. Die Trennung von Verbindungen mit einer Doppelbindung im Ring B wird durch das Fehlen oder Vorhandensein einer Methylgruppe an C-14 beeinflußt.

Tabelle 6 : Prozentuale Zusammensetzung der verestert vorliegenden Methylsterine und ihre RRT bezogen auf ß-Sitosterin an der OV-17-Säule
(In Klammern Literaturwerte von ITOH und Mitarb., 1974a; JEONG und Mitarb., 1975b)

Fraktion	Methylsterin	%	RRT	
			frei	Acetat
I	Gramisterol	20	1,12 (1,13)	1,44 (1,46)
II	Obtusifoliol	16	0,95 (0,94)	1,23 (1,21)
	Cycloeucalenol	3	1,12 (1,11)	1,46 (1,45)
III	Citrostadienol	22	1,48 (1,52)	1,88 (1,97)
IV	31-Norlanosterol	5	0,86 (0,86)	1,10* -
	31-Norcycloartenol	1	0,98 (0,99)	1,31** -
V	31-Norlanost-8-en-3ß-ol	9	0,73 (0,70)	0,94*** -
	Lophenol	24	0,86 (0,83)	1,10 (1,08)

* RRT bezogen auf Cholesterinacetat 1,32 (1,33)
** RRT bezogen auf Cholesterinacetat 1,57 (1,57)
*** RRT bezogen auf Cholesterinacetat 1,11 (1,11)
} ITOH und Mitarb., 1978a

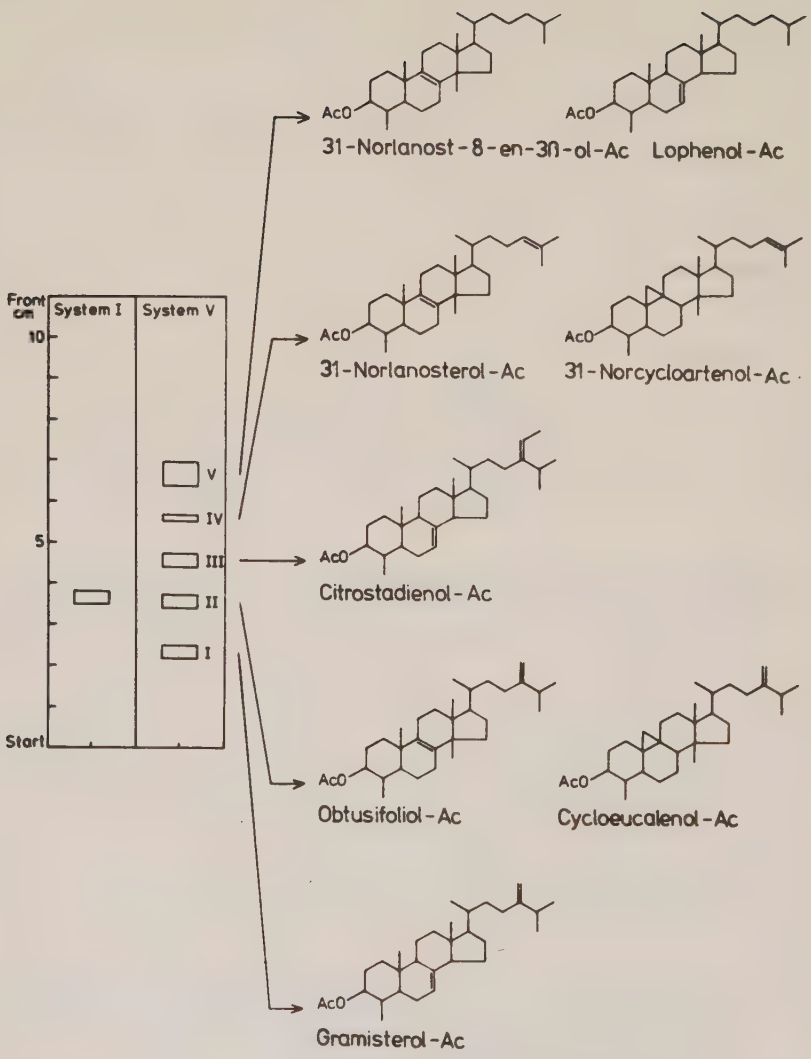


Abbildung 33 : Strukturformeln der isolierten Methylsterinacetate und ihr Laufverhalten an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten (DC-System V)

Nach den dc, gc und gc/ms Untersuchungen bilden die verestert vorliegenden Methylsterine der Blätter ein Gemisch aus Gramisterol, Obtusifoliol, Cycloeucalenol, Citrostadienol, 31-Norlanosterol, 31-Norcycloartenol, 31-Norlanost-8-en-3ß-ol und Lophenol. In Tabelle 6 ist die aus den Gaschromatogrammen ermittelte prozentuale Zusammensetzung der Fraktion wiedergegeben.

4.2. Die frei vorliegenden Methylsterine

4.2.1. Isolierung

In den Blättern von S. albus waren dc frei vorliegende Methylsterine nachweisbar (s. Abb. 1, S. 14). Ihre Isolierung erfolgte durch präparative DC im System I aus der bei der SC des Petrolätherextraktes anfallenden Fraktion J (s. Exp. Teil,S. 188). Danach lagen 5,1 mg eines dc einheitlichen Kristallisats vor, das dc und in der Färbung mit Molybdatophosphorsäure mit den aus den Esterfraktionen isolierten Methylsterinen identisch war.

4.2.2. Identifizierung

Zur Identifizierung der frei vorliegenden Methylsterine wurde das Kristallisat acetyliert und an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten im DC-System V aufgetrennt. Die analog durchgeführten DC- und GC-Analysen ergaben dieselbe qualitative Zusammensetzung wie bei den verestert vorliegenden Methylsterinen, d.h. Gramisterol, Obtusifoliol, Cycloeucalenol, Citrostadienol, 31-Norlanosterol, 31-Norcycloartenol, 31-Norlanost-8-en-3ß-ol und Lophenol liegen

in den Blättern von S. albus auch frei vor. Die ermittelten präparativen Aubeuten (freie Methylsterine 0,002 %, aus der Esterfraktion gewonnene Methylsterine 0,009 %, bezogen auf das Blatt-Trockengewicht) deuten darauf hin, daß die Methylsterine in den Blättern hauptsächlich verestert vorkommen.

5. Die Sterine

5.1. Die frei vorliegenden Sterine

5.1.1. Isolierung

Aus der DC-Untersuchung des Petrolätherextraktes der Blätter und seines unverseifbaren Anteils ging hervor, daß, anders als bei den Triterpenen und Methylsterinen, die Hauptmenge der Sterine frei vorliegt (s. Abb. 1, S. 14). Daher wurden zuerst die frei vorliegenden Sterine untersucht.
Hierzu wurden 340 mg von der bei der SC des Petrolätherextraktes erhaltenen Fraktion E (s. Tab.,25 S. 185) erneut an Kieselgel mit Benzol/Äther (9 : 1, v : v) chromatographiert. Hierbei fielen 174 mg Sterine an, die in den DC-Systemen I, III und IV einheitlich waren. Sie hatten die gleiche Laufhöhe wie ein Gemisch aus Cholesterin, Stigmasterin, Campesterin und ß-Sitosterin und zeigten wie diese mit Molybdatophosphorsäure und LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz das für Δ^5-Sterine typische Farbspiel von rot, rot-violett über blau nach grün. Zur Identifizierung des Steringemisches wurden die freien Verbindungen und die daraus hergestellten Acetate herangezogen.

5.1.2. Charakterisierung durch Schmelzpunkt, spezififische Drehung und IR-Spektrum

Die weißen, plättchenförmig kristallisierenden Sterine hatten einen Schmelzpunkt von 132-134°C, ihre Acetate von 120-122°C (aus Aceton). Dieses entsprach den Angaben von SENDRA u. JANECZKO (1973), die für die aus den Schneebeerenblättern isolierten Sterine einen Schmelzpunkt von 135-137°C und für ihre Acetate von 118-122°C fanden.

Die spezifische Drehung der Sterinacetate $[\alpha]_D^{20} = -36°$ (Chloroform) stimmte mit der von LAWRIE und Mitarb. (1964) für die acetylierten Sterine der Rinde von Sambucus nigra gefundenen überein ($[\alpha]_D^{20} = -36°$).

Das IR-Spektrum (s. Abb. 34) zeigte neben den allgemeinen CH-Valenzschwingungen der gesättigten Kohlenwasserstoffe im Bereich von 2850-3000 cm^{-1} Absorptionsbanden bei 1450 cm^{-1} (Methylengruppe) und 1730 bzw. 1245 cm^{-1} (Estergruppe). Die Absorption in dem der C=C Doppelbindung zugehörenden Bereich war bei 1670 cm^{-1} sehr gering (fehlende Konjugation, vgl. KRAFT, 1975; Δ^5-Doppelbindung: 1669-1672 cm^{-1}). Die Banden bei 1035, 1022 (Schulter) sowie 956, 879 und 838 cm^{-1} sind nach IDLER und Mitarb. (1953) für Δ^5-Sterine charakteristisch. Das Dublett im Bereich von 1375 cm^{-1} weist auf geminale Methylgruppen hin (1370-1382 cm^{-1}; Kraft, 1975). Die kleine Schwingung bei 970 cm^{-1} deutet auf die Anwesenheit von Sterinen mit einer Δ^{22}-Doppelbindung hin (Stigmasterin;

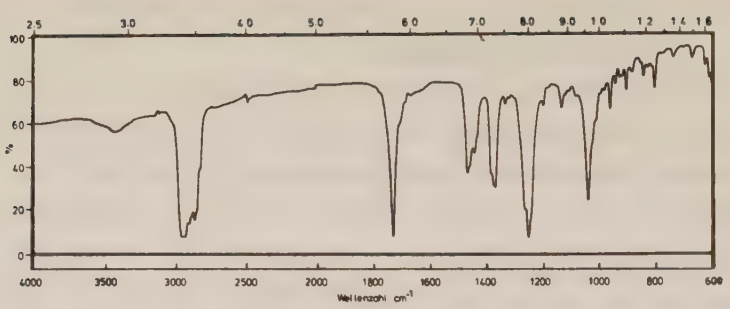


Abbildung 34 : IR-Spektrum der isolierten Sterine (Acetate)

JOHNSON und Mitarb., 1957). Sie ist in dem vorliegenden Spektrum nur wenig ausgeprägt, so daß Sterine mit einer Δ^{22}-Doppelbindung nur in sehr geringer Menge vorliegen dürften.

5.1.3. Identifizierung durch GC und GC/MS

Zur Identifizierung einzelner Komponenten des komplex zusammengesetzten Steringemisches wurden die freien Sterine sowie deren Acetate gc an der OV-17- und der SE-30-Säule untersucht.

An der OV-17-Säule traten im GC jeweils fünf Peaks auf, die durch Zumischen der Vergleichssubstanzen als Cholesterin, Campesterin und/oder 24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin sowie Isofucosterin identifiziert wurden (s. Abb. 35 u. Tab. 7). Die erhaltenen RRT-Werte für die untersuchten Sterine stimmten mit den Angaben von ITOH und Mitarb. (1974a) sowie JEONG und Mitarb. (1974) überein. Das GC der SE-30-Säule zeigte nur vier Peaks, da hier nicht nur Campesterin

und 24-Methylencholesterin, sondern auch ß-Sitosterin und Isofucosterin kritische Paare bilden (s. Tab. 7). Die Strukturformeln der genannten Sterine sind in Abbildung 41, S. 83 wiedergegeben.

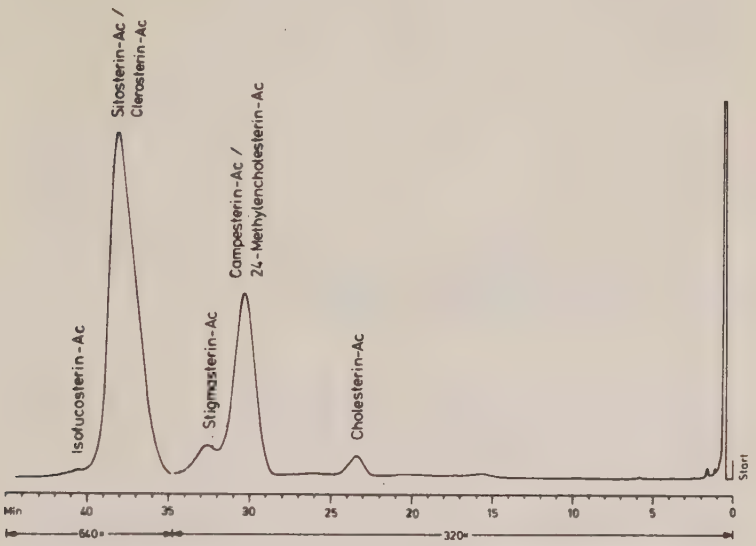


Abbildung 35 : GC der isolierten, frei vorliegenden Sterine (als Acetate)
(Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

Tabelle 7 : GC-Untersuchungen der isolierten freien Sterine und ihrer Acetate

Sterin	OV-17		SE-30	
	frei	Acetat	frei	Acetat
Cholesterin	0,63	0,82	1,00	1,00
Campesterin	0,81	1,07	1,27	1,27
24-Methylencholesterin	0,82	1,08	1,22	1,22
Stigmasterin	0,88	1,16	1,38	1,38
Clerosterin	1,00	1,28	1,56	1,56
ß-Sitosterin	1,00	1,34	1,56	1,56
Isofucosterin	1,11	1,46	1,59	1,59

OV-17: RRT bezogen auf ß-Sitosterin (RT 28,5 Min.)
SE-30: RRT bezogen auf Cholesterin (RT 16,5 Min.) bzw. Cholesterinacetat (RT 22 Min.)

Zur Absicherung des dc und gc Ergebnisses wurden die freien Sterine einer GC/MS-Analyse an einer OV-101-Kapillarsäule unterworfen. Freie Sterine geben im Massenspektrum einen Molekülpeak. Immer auftretende Spaltprodukte resultieren aus der Sprengung der von den quartären C-Atomen 10 und 13 ausgehenden Bindungen. Werden nur die angulären Methylgruppen eliminiert, so führt dies zur Bildung eines Fragmentes M^+-15. Als Hydroxysteroide neigen die Sterine weiterhin zur Abspaltung von Wasser, so daß als Bruchstücke die Fragmente M^+-H_2O und M^+-(CH_3 + H_2O) auftreten. Weitere charakteristische Bruchstücke der Δ^5-Sterine sind M^+-[H_2O + 67 (C_5H_7)], das durch Verlust von C_1-C_5 entstehen dürfte, M^+-[H_2O + 93 (C_7H_9)], das sich nach Eliminierung von C_1-C_7 bildet, M^+-[H_2O + 121 (C_9H_{13})], das durch Abspaltung der Ringe C und D sowie der Seitenkette zustande kommt sowie M^+-[H_2O + 108 (C_8H_{12})]. Letzteres Bruchstück, dessen Entstehung noch ungeklärt ist, hat bei den freien

Sterinen eine geringe, bei den acetylierten Sterinen meistens eine größere Intensität (vgl. KNIGHTS, 1967; WYLLIE und Mitarb., 1977).

Anhand der Molpeaks und der genannten Fragmente lassen sich die pflanzlichen Δ^5-Sterine identifizieren. Da bei diesen Spaltprodukten die für die verschiedenen Sterine charakteristische Seitenkette erhalten bleibt, unterscheiden sich die Massenzahlen dieser Fragmente stets nur durch die Differenz der Massenunterschiede ihrer Seitenkette. Desweiteren tritt eine Anzahl von Bruchstücken auf, die für Δ^5-Sterine charakteristisch sind. Es handelt sich dabei um das Fragment m/e 273, das durch Abspaltung der Seitenkette an C-17 gebildet wird (M^+-Seitenkette). Durch zusätzliches Abspalten von Wasser aus dem Sterinkern entsteht das Fragment m/e 255, d.h. M^+-(Seitenkette + H_2O). Weiterhin erfolgt bei den Sterinen leicht eine Spaltung zwischen den C-Atomen 13 und 17. Dieses Primärspaltprodukt wird weiter abgebaut, wobei am häufigsten ein Bruch zwischen der Bindung C-14 und C-15 stattfindet (SPITELLER, 1966). Als Spaltprodukte resultieren die Fragmente 231 und 213, d.h. M^+-(Seitenkette + 42) bzw. M^+-(Seitenkette + 42 + H_2O). Das Primärspaltprodukt kann jedoch auch durch einen Bruch zwischen C-15 und C-16 weiter abgebaut werden, woraus Spaltprodukte mit den Massenzahlen 246 und 229 resultieren, d.h. M^+-(Seitenkette + 27) bzw. M^+-(Seitenkette + 27 + OH^-). Die Fragmente m/e 273, 255, 246, 231, 229 und 213 sind so allen Δ^5-Sterinen gemeinsam.

Δ^5-Sterine, die in der Seitenkette eine Doppelbindung tragen (z.B. Stigmasterin: Δ^{22}; 24-Methylencholesterin und Isofucosterin: $\Delta^{24\ (28)}$), geben sich im Massenspektrum durch das

Fragment 271 zu erkennen, das durch Verlust der Seitenkette an C-17 unter gleichzeitiger Umlagerung zweier H-Atome gebildet wird. Außerdem treten bei ihnen charakteristische Peaks bei m/e 314, 296 und 281 auf, die durch Verlust nur eines Teils der Seitenkette entstehen und durch eine McLafferty-Umlagerung formuliert werden können. Das Fragment 314 entspricht so M^+-(C_{23} bis C_{27} + 1H). Bei den Δ^5-Sterinen mit einer $\Delta^{24\ (28)}$-Doppelbindung in der Seitenkette hat dieser Peak eine größere Intensität als das Fragment bei m/e 271 und ist so charakteristisch für $\Delta^{5,\ 24\ (28)}$-Sterine. Die Fragmente m/e 296 und 281 können davon ausgehend folgendermaßen formuliert werden: M^+-(C_{23}-C_{27} + 1H + H_2O) bzw. M^+-(C_{23}-C_{27} + 1H + H_2O + CH_3) (vgl. u.a. auch KNIGHTS, 1967; JEONG und Mitarb., 1974; NES und Mitarb., 1977; TAKAGI und Mitarb., 1979).

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der GC/MS-Analysen der freien Sterine wiedergegeben. Die im GC (OV-101-Kapillarsäule) auftretenden vier Peaks konnten aufgrund der entstehenden Fragmente als Cholesterin, Campesterin, 24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin und Isofucosterin identifiziert werden.

Da Campesterin und 24-Methylencholesterin sowie Isofucosterin und ß-Sitosterin sich auf der OV-101-Kapillarsäule nicht trennen, wurde von diesen kritischen Paaren jeweils ein gemeinsames Massenspektrum erhalten, in denen sich anhand der Molekülpeaks und der genannten charakteristischen Fragmente das Vorliegen der beiden Sterine jeweils sicher erkennen ließ. Da in diesen beiden Fällen daneben jedoch einzelne Fragmente beiden Sterinen zugeordnet werden müssen, ist eine Angabe der relativen Intensitäten der einzelnen Spaltprodukte nicht möglich.

Tabelle 8 : Ergebnisse der MS-Untersuchungen der Sterine

Fragmentierung	Cholesterin		Campesterin		24-Methylen-cholesterin		Stigmasterin		Clerosterin		ß-Sitosterin		Isofucosterin	
	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.
M^+ [Molekülion]	386	(100%)	400		398		412	(68%)	412		414		412	
$M^+ - CH_3$	371	(33%)	385		383		397	(24%)	397		399		397	
$M^+ - H_2O$	368	(43%)	382		380		394	(34%)	394		396		394	
$M^+ - [CH_3 + H_2O]$	353	(43%)	367		365		379	(32%)	379		381		379	
$M^+ - 43$ (C_{25}-C_{27})	-	-	-		-		369	(32%)	-		-		-	
$M^+ - [43 + H_2O]$	-	-	-		-		351	(42%)	-		-		-	
$M^+ - [(C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-		314		314	(26%)	314		-		314	
$M^+ - [H_2O + 67]$	301	(50%)	315		313		327	(21%)	327		329		327	
$M^+ - [CH_3 + (C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-		299		299	(37%)	299		-		299	
$M^+ - [H_2O + (C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-		296		296	(26%)	296		-		296	
$M^+ - [H_2O + 93]$	275	(59%)	289		287		301	(32%)	301		303		301	
$M^+ - [CH_3 + H_2O + (C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-		281		281	(21%)	281		-		281	
$M^+ - [SK$ (Seitenkette)]	273	(30%)	273		273		273	(37%)	273		273		273	
$M^+ - [SK + 2H]$	271	(9%)	271		271		271	(89%)	271		271		271	
$M^+ - [H_2O + 108$ (C_8H_{12})]	260	(7%)	274		272		286	(12%)	286		288		286	
$M^+ - [H_2O + 121]$	247	(26%)	261		259		273	(37%)	273		275		273	
$M^+ - [SK + H_2O]$	255	(33%)	255		255		255	(100%)	255		255		255	
$M^+ - [SK + H_2O + 2H]$	-	-	-		253		253	(47%)	253		-		253	
$M^+ - [SK + 27$ (C_{16}-C_{17})]	246	(13%)	246		246		246	(21%)	246		246		246	
$M^+ - [SK + 42$ (C_{15}-C_{17})]	231	(39%)	231		231		231	(42%)	231		231		213	
$M^+ - [SK + 27 + OH^-]$	229	(30%)	229		229		229	(58%)	229		229		229	
$M^+ - [SK + 27 + H_2O]$	228	(13%)	228		228		228	(32%)	228		228		228	
$M^+ - [SK + 42 + H_2O]$	213	(34%)	213		213		213	(84%)	213		213		213	
$M^+ - [SK + 42 + H_2O + 2H]$	211	(13%)	211		211		211	(53%)	211		211		211	

5.1.4. Auftrennung des acetylierten Steringemisches an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten und GC- sowie GC/MS-Analyse der einzelnen Fraktionen

24-Methylencholesterin- und Isofucosterinacetat lassen sich aufgrund ihrer $\Delta^{24(28)}$-Doppelbindung an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten von den anderen nachgewiesenen Sterinen abtrennen (vgl. VROMAN u. COHEN, 1967; WOJCIECHOWSKI und Mitarb., 1973; ITOH und Mitarb., 1978a). Zur weiteren Identifizierung dieser beiden Verbindungen wurde deshalb das acetylierte Steringemisch im DC-System V an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten chromatographiert. Im Chromatogramm traten vier Flecke auf, von denen die beiden unteren mit 24-Methylencholesterin- und Isofucosterinacetat

Abbildung 36 : DC der acetylierten freien Sterine aus den Blättern von S. albus (DC-System V)

1 : 24-Methylencholesterinacetat
2 : Isofucosterinacetat
3 : Gemisch aus den Acetaten von Stigmasterin, ß-Sitosterin und Cholesterin
4 : acetylierte Sterine aus S. albus

identisch waren (hRf 14 bzw. 29; s. Abb. 36). Der Hauptfleck (hRf 49) lag auf gleicher Höhe wie ein Gemisch aus Stigmasterin-, Cholesterin- und ß-Sitosterinacetat. In geringen Spuren trat darüber ein weiterer Fleck auf, bei dem es sich aufgrund der Laufhöhe und der Färbung mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz um 5α-gesättigte Sterinacetate handeln dürfte.

Anschließend wurden 48 mg des acetylierten Steringemisches in diesem System V präparativ aufgetrennt und die erhaltenen drei Fraktionen der GC- und GC/MS-Analyse zugeführt.
In Fraktion I (hRf 14) fielen 1,4 mg der mit 24-Methylencholesterinacetat auf gleicher Höhe liegenden Verbindung an. Im GC (OV-17-Säule) erschien nur ein Peak (s. Abb. 38a), dessen Massenspektrum mit dem von 24-Methylencholesterinacetat identisch war (s. Abb. 37 u. Tab. 9).

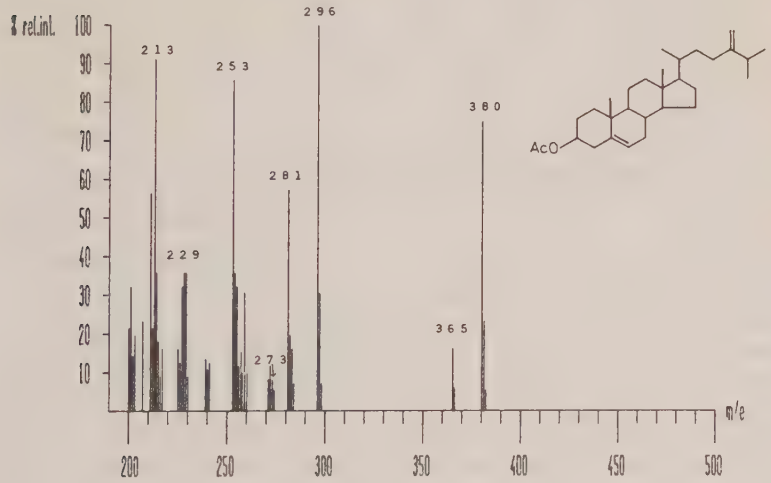


Abbildung 37 : Massenspektrum von 24-Methylencholesterinacetat

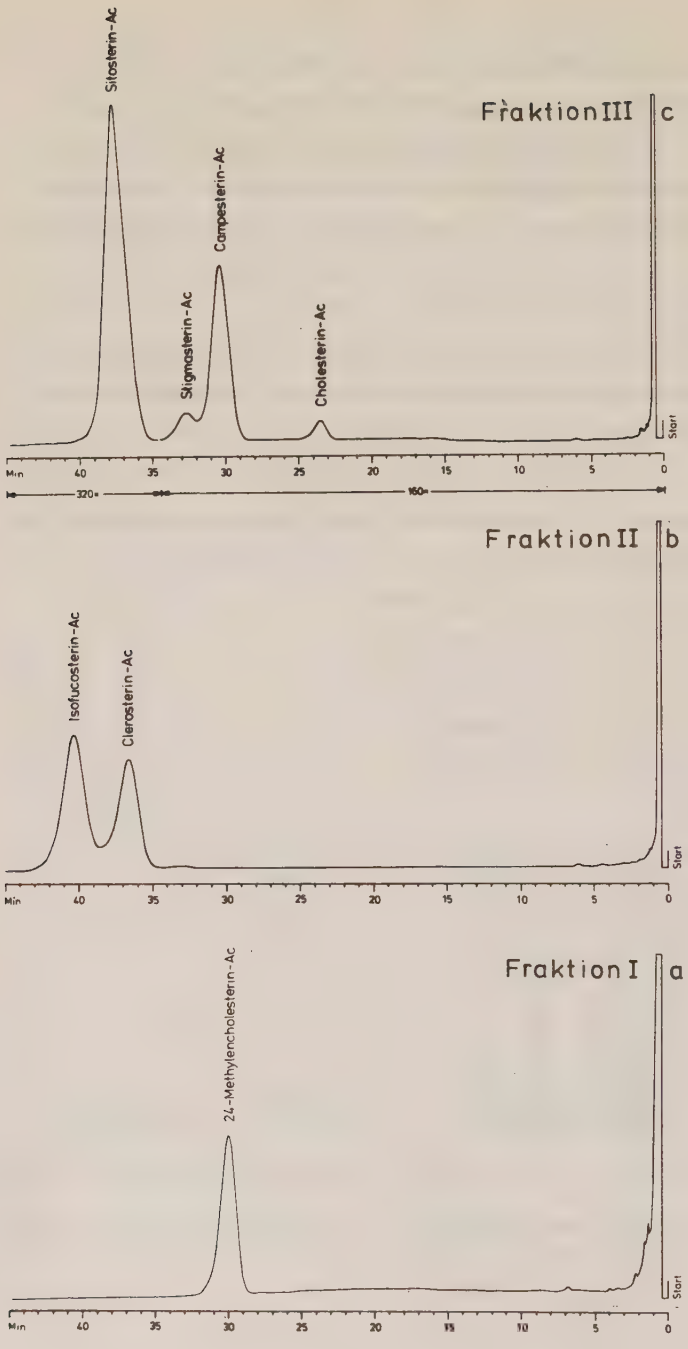


Abbildung 38 a-c : Gaschromatogramme der isolierten Sterinfraktionen I-III
(Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

Fraktion II (3,9 mg, hRf 29) zeigte dagegen im GC der OV-17-Säule zwei Peaks (RRT bezogen auf ß-Sitosterin 1,28 bzw. 1,46, s. Abb. 38b), von denen der mit der RRT 1,46 im direkten Vergleich mit Isofucosterinacetat identisch war.

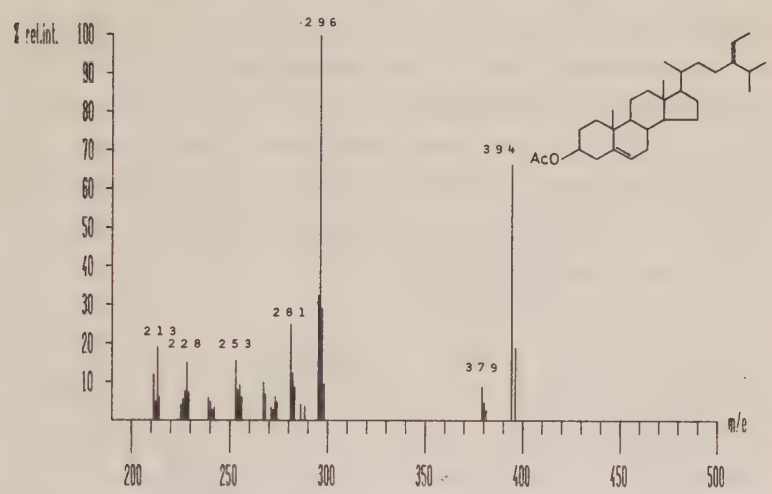


Abbildung 39 : Massenspektrum von Isofucosterinacetat

Das Massenspektrum (s. Abb. 39 u. Tab. 9) stimmte in der Fragmentierung und Intensität der Spaltprodukte mit demjenigen von Isofucosterinacetat überein.
Bei der zweiten Komponente, von der keine Vergleichssubstanz zur Verfügung stand, sollte es sich aufgrund derselben Laufhöhe auf $AgNO_3$-Kieselgelplatten wie Isofucosterinacetat (Stigmasta-5,24(28)-dien-3ß-ol) um das isomere Clerosterinacetat (Stigmasta-5,25-dien-3ß-ol) handeln (SUCROW, 1960). Für das Acetat dieses Sterins gaben NES und Mitarb. (1977) für die

XE-60-Säule eine auf Cholesterinacetat bezogene RRT von 1,55 an. Die gc Trennung der Fraktion II auf dieser Säule lieferte ebenfalls zwei Peaks, von denen einer wiederum mit Isofucosterinacetat übereinstimmte (RRT 1,67, bezogen auf Cholesterinacetat). Der andere Peak hatte mit 1,55 dieselbe relative Retentionszeit wie Clerosterinacetat. Das Massenspektrum dieser Verbindung stimmte in der Fragmentierung und in den Intensitäten der Spaltprodukte (s. Abb. 40 u. Tab. 9) mit den Literaturangaben für Clerosterinacetat überein (vgl. RUBINSTEIN u. GOAD, 1974; ADLER u. KASPRZYK, 1975). Aufgrund der DC-, GC- und GC/MS-Analysen handelt es sich deshalb bei diesem Sterin um Clerosterin.

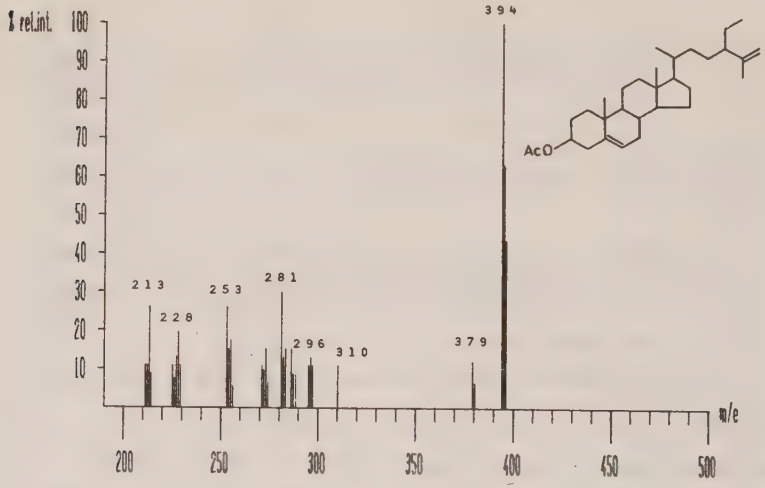


Abbildung 40 : Massenspektrum von Clerosterinacetat

Fraktion III (hRf 49), die mit 29,9 mg die Hauptmenge lieferte, zeigte im GC (OV-17-Säule) vier Komponenten (s. Abb. 38c, S. 78), die im direkten Vergleich mit den Acetaten von Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin und ß-Sitosterin übereinstimmten. Die Massenspektren dieser Verbindungen (Fragmentierung s. Tab. 9) bestätigten diese Zuordnung und das Ergebnis der MS-Analyse der nicht acetylierten Sterine.
Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen führen die Blätter von S. albus die Sterine Cholesterin, Campesterin, 24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin, Isofucosterin und Clerosterin. Die quantitative Zusammensetzung der frei vorliegenden Sterine ist in Tabelle 14, S. 105 angegeben.

5.2. Die verestert vorliegenden Sterine

Aus den Esterfraktionen F und G des Petrolätherextraktes wurden nach Hydrolyse neben Triterpenen und Methylsterinen 62 mg Sterine isoliert (s. Exp. Teil, S. 187). Die Zusammensetzung dieser verestert vorliegenden Sterine wurde analog der frei vorliegenden Sterine analysiert. Durch DC-, GC- und GC/MS-Analysen wurden in dem Steringemisch Cholesterin, Campesterin, 24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin, Isofucosterin und Clerosterin identifiziert. Die Zusammensetzung der in den Blättern von S. albus verestert vorliegenden Sterine stimmt damit qualitativ mit den frei vorliegenden Sterinen überein. Die quantitative Zusammensetzung (s. Tab. 14, S. 105) weist nur geringe Unterschiede auf, die in einem etwas geringeren Anteil an Stigmasterin und einem etwas höheren Anteil an Isofucosterin gegeben sind.

Tabelle 9 : Ergebnisse der MS-Untersuchungen der acetylierten Sterine

Fragmentierung	Cholesterin-Ac		Campesterin-Ac		24-Methylen-cholesterin-Ac		Stigmasterin-Ac		Clerosterin-Ac		β-Sitosterin-Ac		Isofucosterin-Ac	
	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.	m/e	rel.Int.
M^+ [Molekülion]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - CH_3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M^+ - AcOH	368	(100%)	382	(100%)	380	(75%)	394	(100%)	394	(100%)	396	(100%)	394	(67%)
$M^+ - [CH_3 + AcOH]$	353	(24%)	367	(17%)	365	(16%)	379	(4%)	379	(12%)	381	(17%)	379	(9%)
$M^+ - 43$ (C_{25}-C_{27})	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [43 + AcOH]$	-	-	-	-	-	-	351	(10%)	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [(C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [AcOH + 67]$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [CH_3 + (C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [AcOH + (C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-	-	296	(100%)	296	(5%)	296	(13%)	-	-	296	(100%)
$M^+ - [AcOH + 93]$	275	(2%)	289	(<2%)	-	-	-	-	-	-	303	(2%)	-	-
$M^+ - [CH_3 + AcOH + (C_{23}$-$C_{27}) + 1H]$	-	-	-	-	281	(57%)	281	(8%)	281	(30%)	-	-	281	(25%)
$M^+ - [SK$ (Seitenkette)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [SK + 2H]$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$M^+ - [AcOH + 108 (C_8H_{12})]$	260	(26%)	274	(19%)	272	(13%)	-	-	286	(15%)	288	(18%)	286	(5%)
$M^+ - [AcOH + 121]$	247	(28%)	261	(17%)	259	(30%)	-	-	273	(15%)	275	(15%)	273	(6%)
$M^+ - [SK + AcOH]$	255	(20%)	255	(16%)	255	(32%)	255	(37%)	255	(17%)	255	(16%)	255	(9%)
$M^+ - [SK + AcOH + 2H]$	-	-	253	(3%)	253	(86%)	253	(14%)	253	(26%)	253	(<2%)	253	(16%)
$M^+ - [SK + 27 (C_{16}$-$C_{17})]$	-	-	288	(3%)	-	-	-	-	288	(9%)	288	(18%)	288	(4%)
$M^+ - [SK + 42 (C_{15}$-$C_{17})]$	-	-	273	(3%)	273	(8%)	-	-	273	(15%)	273	(3%)	273	(6%)
$M^+ - [SK + 27 + AcO^-]$	229	(5%)	229	(5%)	229	(36%)	229	(3%)	229	(11%)	229	(3%)	229	(7%)
$M^+ - [SK + 27 + AcOH]$	228	(5%)	228	(6%)	228	(36%)	228	(14%)	228	(20%)	228	(3%)	228	(15%)
$M^+ - [SK + 42 + AcOH]$	213	(16%)	213	(14%)	213	(91%)	213	(11%)	213	(26%)	213	(13%)	213	(19%)
$M^+ - [SK + 42 + AcOH + 2H]$	211	(<2%)	211	(<2%)	211	(56%)	211	(7%)	211	(11%)	211	(<2%)	211	(12%)

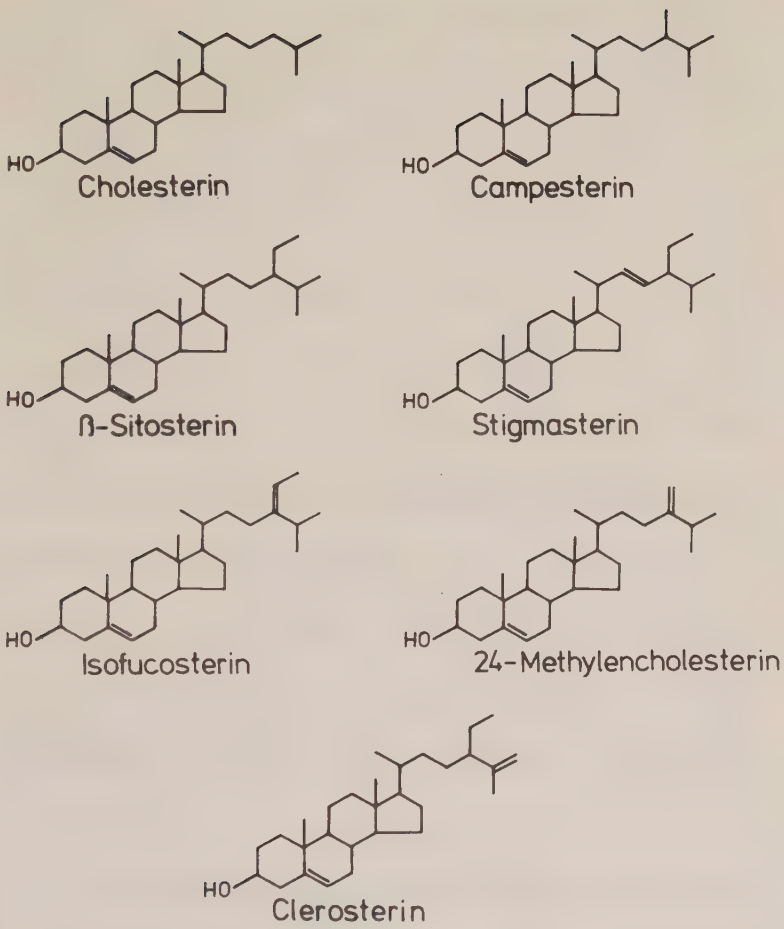


Abbildung 41 : Strukturformeln der identifizierten Sterine

6. Die sauren Komponenten der Triterpen-, Methylsterin- und Sterinester

6.1. Identifizierung durch DC und GC

Nach Abtrennung des unverseifbaren Anteils aus dem alkalischen Hydrolysat der dc einheitlichen Esterfraktion G (s. Tab. 26 bzw. S. 16) und Ansäuern des Hydrolysats wurden die Säuren mit Petroläther ausgeschüttelt. Bei den hierbei anfallenden sauren Esterbestandteilen (64,7 mg) handelte es sich um die sauren Komponenten der Triterpen-, Methylsterin- und Sterinester sowie verestert vorliegender aliphatischer Alkohole (vgl. u.a. WOJCIECHOWSKI und Mitarb., 1972; WILLUHN u. KÖSTENS, 1974; NORDBY u. NAGY, 1974; NEIDLEIN u. DALDRUP, 1980). Die dc Analyse im System VI wies sie als Fettsäuren aus (s. Abb. 42). Die Anwesenheit von Hydroxy- und Epoxyfettsäuren, die sich in diesem System von den sich nicht trennenden gesättigten und ungesättigten Fettsäuren differenzieren lassen, konnte ausgeschlossen werden.

Zur gc Identifizierung wurden die Fettsäuren mit Diazomethan methyliert. Im DC-System VII ließen sich mit Vergleichssubstanzen die Fettsäuremethylester (FSME) als blau fluoreszierende Flecke nachweisen (s. Abb. 42). Vor der GC-Analyse wurden sie durch präparative DC in diesem System von einigen im UV-Licht dunkel erscheinenden Komponenten gereinigt. Die gc Trennung erfolgte an einem Paar Diäthylenglykolsuccinat-Säulen (DEGS) (vgl. u.a. BERI u. LEMON, 1970; NEIDLEIN u. DALDRUP, 1980). Abbildung 43a zeigt das GC der aufgetrennten FSME. Durch Zumischen der entsprechenden Vergleichssubstanzen wurde Laurinsäure und die homologe Reihe

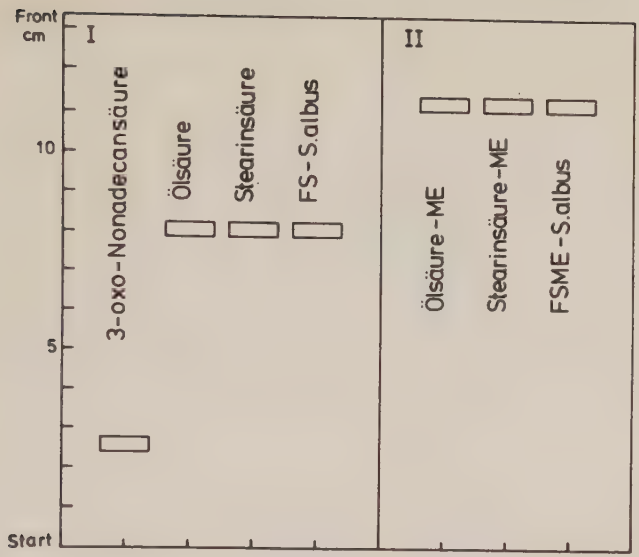


Abbildung 42 : DC der Fettsäuren (I) und ihrer Methylester (II) (I: System VI; II: System VII; Detektion: Pyranin, blaue Fluoreszenz)

der gesättigten Fettsäuren der C-Zahlen 14-24 sowie die einfach und zweifach ungesättigten C_{18}-Säuren Öl- und Linolsäure nachgewiesen.

6.2. Auftrennung in gesättigte und ungesättigte Fettsäuremethylester

Da bei der gc Auftrennung der FSME "kritische Paare" von höheren gesättigten und kürzerkettigen, aber ungesättigten FSME mit gleicher Retentionszeit existieren, wurden die

FSME durch präparative DC in eine Fraktion der gesättigten und eine der ungesättigten FSME aufgetrennt. Hierzu wurden die ungesättigten FSME nach JANTZEN u. ANDREAS (1959) in die Hg(II)-acetat-Addukte überführt (s. Exp. Teil, S. 190) und von den nicht reagierenden gesättigten FSME durch präparative DC nach MANGOLD u. KAMMERECK (1961) im DC-System VIII abgetrennt. Hierbei bleiben die Hg(II)-acetat-Addukte am Start liegen, während die gesättigten FSME zur Laufmittelfront wandern (s. Abb. 44).

Die gc Untersuchung der gesättigten FSME bestätigte die Anwesenheit der bereits identifizierten Verbindungen (s. Abb. 43b).

Ein Teil der ungesättigten FSME wurde aus den Hg(II)-acetat-Addukten durch die Adduktspaltung nach GLASER und Mitarb. (1962) wieder gewonnen und gc untersucht (s. Exp. Teil, S. 190). Hierbei wurden neben der Öl- und Linolsäure zusätzlich noch die einfach ungesättigte Palmitoleinsäure nachgewiesen (s. Abb. 43c). Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden die ungesättigten FSME nach Hydrierung erneut gc untersucht (s. Exp. Teil, S. 191). Im GC traten danach erwartungsgemäß die gesättigten Säuren, Palmitin- und Stearinsäure, auf.

6.3. Auftrennung der ungesättigten Fettsäuremethylester nach Anzahl der Doppelbindungen

Eine Möglichkeit, die Hg(II)-acetat-Addukte nach Zahl ihrer Doppelbindungen dc aufzutrennen, bietet das Fließmittel nach MANGOLD u. KAMMERECK (1961) n-Propanol/Eisessig (100 : 1,

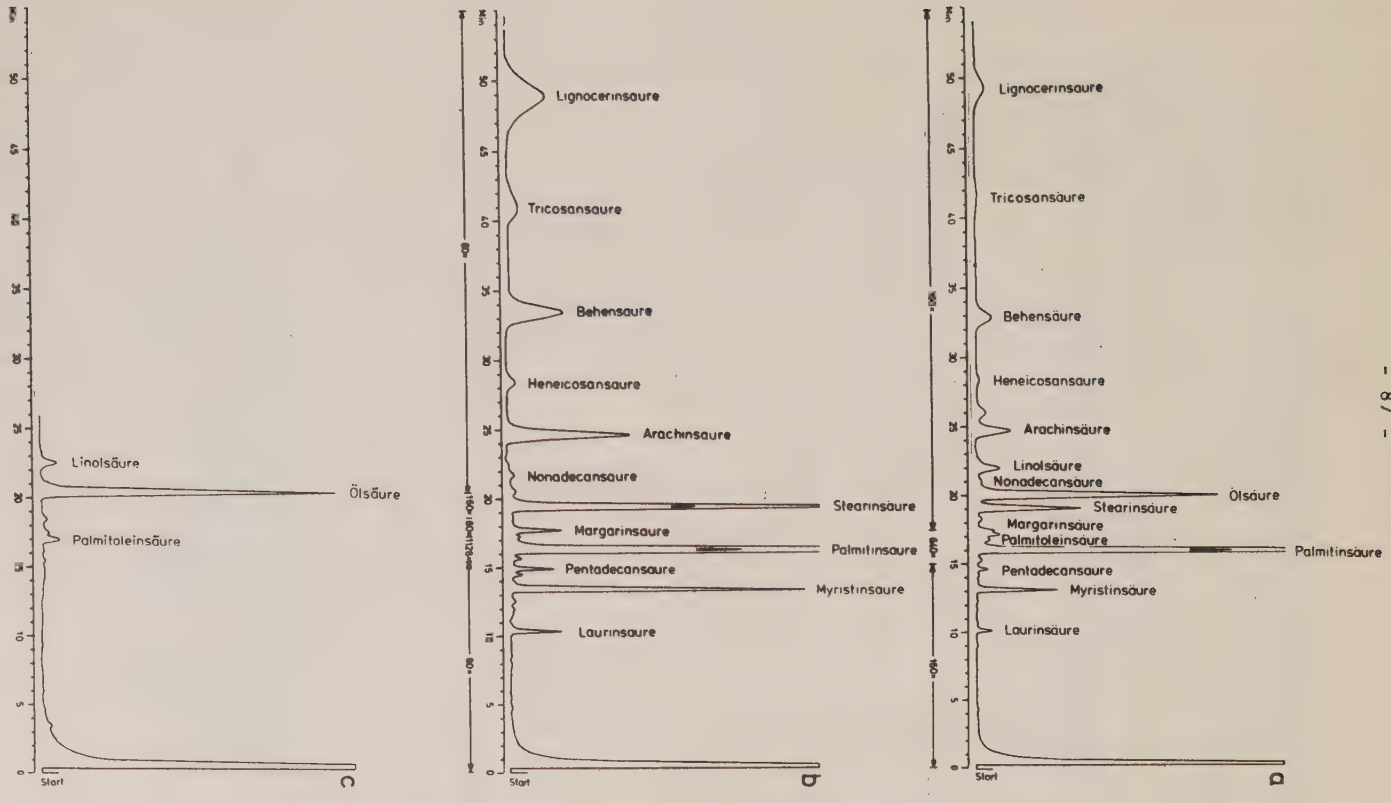


Abbildung 43 a-c : Gaschromatogramme der gesamten (a), der gesättigten (b) und der ungesättigten FSME-Fraktion (c)

v : v; System IX). Bei einem Teil der nach Hg(II)-acetat-Adduktbildung erhaltenen Fraktion wurden zunächst die gesättigten FSME im DC-System VIII über eine Laufhöhe von 15,5 cm abgetrennt. Anschließend wurde die getrocknete Platte zur Auftrennung der am Startpunkt liegengebliebenen Addukte im DC-System IX in der gleichen Richtung chromatographiert.

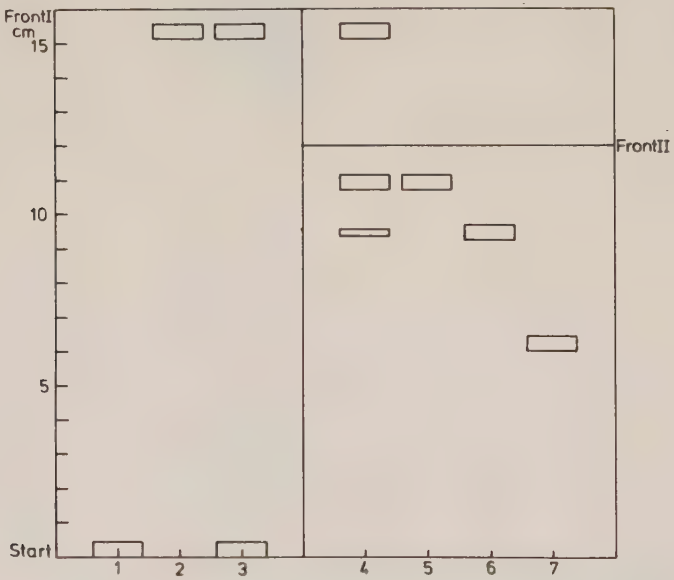


Abbildung 44 : DC der gesättigten FSME und der Hg(II)-acetat-Addukte der ungesättigten FSME
(System VIII (I); System IX (II))

1 : Hg(II)-acetat-Addukt von Ölsäure-ME
2 : Stearinsäure-ME
3 : FSME nach Hg(II)-acetat-Addukt-Bildung
4 : FSME nach Hg(II)-acetat-Addukt-Bildung und aufeinander folgender Entwicklung mit Laufmittel VIII und IX
5 : Hg(II)-acetat-Addukt von Ölsäure-ME
6 : Hg(II)-acetat-Addukt von Linolsäure-ME
7 : Hg(II)-acetat-Addukt von Linolensäure-ME

Nach Sichtbarmachung der Komponenten mit Jod bzw. Dithizonlösung zeigten sich neben den gesättigten FSME zwei rosa gefärbte Flecke, bei denen es sich aufgrund der mitgelaufenen Testsubstanzen um die Addukte von ein- und zweifach ungesättigten FSME handelte (s. Abb. 44). Dreifach ungesättigte FSME konnten nicht nachgewiesen werden. Die beiden Adduktzonen wurden getrennt von den Platten abgeschabt und die FSME durch Adduktspaltung regeneriert. In der Dienzone konnte gc nur Linolsäure nachgewiesen werden, in der Monoenzone Öl- und Palmitoleinsäure. Die quantitative Zusammensetzung der Fettsäurefraktion ist in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10 : Qualitative und quantitative Zusammensetzung der aus der Triterpen-, Methylsterin- und Sterinesterfraktion G isolierten Fettsäuren

Fettsäuremethylester	RRT*	%
Laurinsäure	0,63	<1
Myristinsäure	0,82	4
Pentadecansäure	0,91	1
Palmitinsäure	1,00	52
Palmitoleinsäure	1,05	<1
Margarinsäure	1,09	1
Stearinsäure	1,19	7
Ölsäure	1,26	20
Linolsäure	1,38	3
Nonadecansäure	1,33	<1
Arachinsäure	1,49	4
Heneicosansäure	1,71	<1
Behensäure	1,99	3
Tricosansäure	2,51	<1
Lignocerinsäure	2,88	3

* RRT bezogen auf Palmitinsäuremethylester (RT 16 Min.)

Danach werden in den Blättern von S. albus zur Veresterung der Triterpene, Methylsterine, Sterine und auch der aliphatischen Alkohole in erster Linie Palmitinsäure (52 %), Stearinsäure (7 %) und Ölsäure (20 %) herangezogen. Linolsäure kommt nur in geringen Mengen, Linolensäure überhaupt nicht vor. Auffällig ist dagegen das Vorkommen der langkettigen Fettsäuren der C-Zahlen 19-24 (vgl. auch RADWAN und Mitarb., 1974; NEIDLEIN u. KOCH, 1980).

7. Die Alkane

Bei der sc Auftrennung des Petrolätherextraktes (s. S. 15) wurden als erste Fraktion (A, s. Tab. 25, S. 185) 760 mg eines weißen, wachsartigen Substanzgemisches eluiert (= 0,25 % vom Blatt-Trockengewicht), bei dem es sich aufgrund der Polarität und des DC-Verhaltens um Kohlenwasserstoffe handeln mußte. Das Gemisch schmolz nach Umkristallisation aus Äthanol bei 61-63°C und lag damit im Bereich der in der Literatur für pflanzliche Paraffine angegebenen Werte (u.a. PURDY u. TRUTER, 1963: 61,5-62°C; WILLUHN, 1974: 63-64,5°C; NEIDLEIN u. DALDRUP, 1980: 64-66°C).

Das IR-Spektrum (s. Abb. 49a, S. 99) bestätigte das Vorliegen von Kohlenwasserstoffen. Es zeigte lediglich die für Methyl- und Methylengruppen charakteristischen Absorptionsbanden (2960-2850 cm^{-1}: CH-Valenzschwingung; 1470-1430 und 1390-1370 cm^{-1}: CH- und CH_3-Deformationsschwingungen; 720 cm^{-1}: CH_2-Deformationsschwingung; EGLINTON u. HAMILTON, 1963; WILLIAMS u. FLEMING, 1975; NEIDLEIN u. DALDRUP, 1980).

Vor der gc Analyse wurden die isolierten Kohlenwasserstoffe über Harnstoffadduktbildung (BRIESKORN u. FEILNER, 1968) von eventuell vorhandenen verzweigten Aliphaten gereinigt (s. Exp. Teil,S. 192). Nur 2,8 % der Fraktion waren hierbei mit Harnstoff nicht fällbar und wurden nicht weiter untersucht.

Da die Tetranitromethan-Reaktion negativ ausfiel, lagen nur gesättigte Alkane vor, die gc an der SE-30-Säule untersucht wurden (s. Abb. 45). Die Identifizierung der Einzelkomponenten erfolgte durch Zumischen identischer Substanzen. Das Ergebnis der gc Untersuchung ist in Tabelle 11 wiedergegeben.

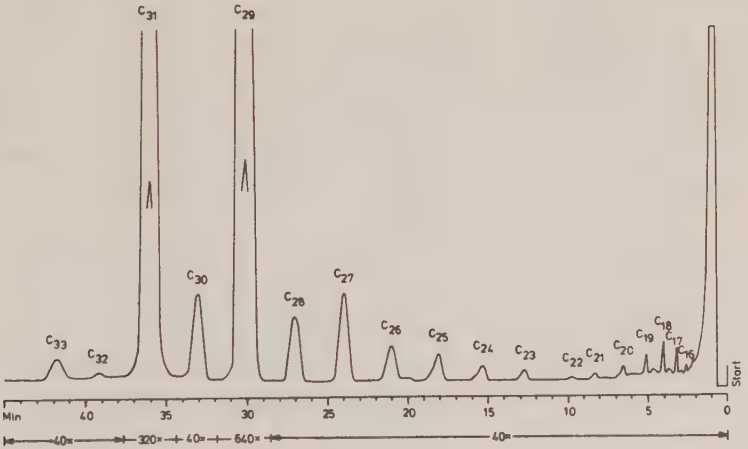


Abbildung 45 : Gaschromatogramm der aliphatischen Kohlenwasserstoffe

(Säule: 3 % Silikongummi SE-30, System I)

Tabelle 11 : Die prozentuale Zusammensetzung der n-Alkane aus den Blättern von S. albus

Alkane	Summenformel	RRT*	%
n-Hexadecan	$C_{16}H_{34}$	0,17	0,1
n-Heptadecan	$C_{17}H_{36}$	0,20	0,1
n-Octadecan	$C_{18}H_{38}$	0,26	0,2
n-Nonadecan	$C_{19}H_{40}$	0,33	0,1
n-Eicosan	$C_{20}H_{42}$	0,42	<0,1
n-Heneicosan	$C_{21}H_{44}$	0,54	<0,1
n-Docosan	$C_{22}H_{46}$	0,64	<0,1
n-Tricosan	$C_{23}H_{48}$	0,83	0,1
n-Tetracosan	$C_{24}H_{50}$	1,00	0,2
n-Pentacosan	$C_{25}H_{52}$	1,18	0,3
n-Hexacosan	$C_{26}H_{54}$	1,37	0,5
n-Heptacosan	$C_{27}H_{56}$	1,57	1,4
n-Octacosan	$C_{28}H_{58}$	1,77	1,0
n-Nonacosan	$C_{29}H_{60}$	1,98	65,2
n-Triacontan	$C_{30}H_{62}$	2,16	1,5
n-Hentriacontan	$C_{31}H_{64}$	2,36	28,8
n-Dotriacontan	$C_{32}H_{66}$	2,56	<0,1
n-Tritriacontan	$C_{33}H_{68}$	2,74	0,3

* RRT bezogen auf n-Tetracosan (RT 15,2 Min.)

Die Kohlenwasserstoffe der Schneebeerenblätter setzen sich aus der homologen Reihe der n-Alkane mit den C-Zahlen 16 bis 33 zusammen, wobei, wie bei Pflanzen allgemein üblich, die Vertreter mit ungerader C-Zahl vorherrschen. Nonacosan

und Hentriacontan stellen die Hauptkomponenten, wofür es ebenfalls zahlreiche Beispiele in der Literatur gibt (u.a. KOLATTUKUDY, 1970a; CROTEAU u. FAGERSON, 1971; CORRIGAN und Mitarb., 1978).

8. Die freien und veresterten primären aliphatischen Alkohole

Bei der chromatographischen Isolierung von Triterpenalkoholen fallen diese in der Regel gemeinsam mit aliphatischen Alkoholen an. Wie auf S. 45 beschrieben erfolgte ihre Abtrennung von den frei vorliegenden Triterpenalkoholen durch Harnstoffadduktbildung (s. Exp. Teil, S. 192), wobei 55 mg primäre aliphatische Alkohole anfielen, die bei 57-60°C schmolzen (u.a. WILLUHN u. KÖSTENS, 1974: 51-53°C; NEIDLEIN u. DALDRUP, 1980: 59-62°C).

Das IR-Spektrum (s. Abb. 49b, S. 99) zeigte neben den von den Kohlenwasserstoffen her bekannten Absorptionsbanden der Methyl- und Methylengruppen (2920, 2850, 1465, 1380, 720 cm^{-1}) die breite Bande der OH-Valenzschwingung zwischen 3200 und 3500 cm^{-1} sowie die Kopplungsschwingung bei 1064 cm^{-1} (vgl. u.a. WILLIAMS u. FLEMING, 1975; WILLUHN u. RICHTER, 1977; NEIDLEIN u. DALDRUP, 1980). Das Spektrum stimmte mit einem Gemisch von aliphatischen Alkoholen der C-Zahlen 16-30 überein.

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fraktion wurde gc mit den freien und acetylierten Alkanolen an einer OV-17-Säule untersucht (s. Abb. 46). Die Einzelkomponenten wurden durch Zumischen von Vergleichssubstanzen identifiziert. Da die längerkettigen Homologen als Vergleiche nicht zur Verfügung standen, wurden diese aufgrund der linearen Beziehung

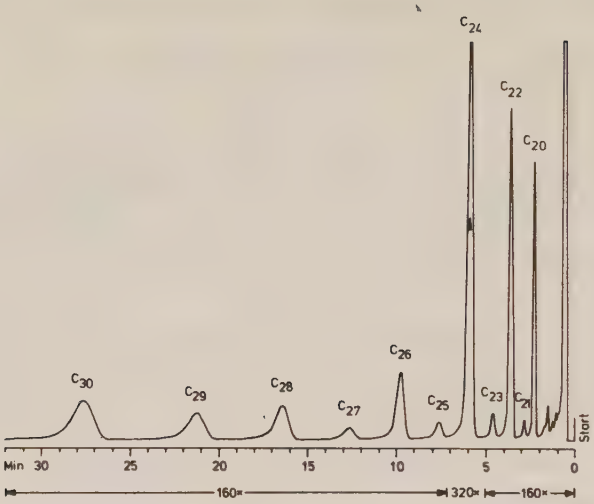


Abbildung 46 : Gaschromatogramm der frei vorliegenden aliphatischen Alkohole
(Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

zwischen dem Logarithmus der Retentionszeit und der Zahl der C-Atome bei homologen Reihen bestimmt (vgl. EGLINTON und Mitarb., 1962). Hierzu wurde das Gemisch isotherm bei 260°C aufgetrennt und die erhaltene Retentionszeit der einzelnen Komponenten logarithmisch gegen die Zahl der C-Atome aufgetragen. Die so erhaltenen Punkte ergaben für die homologen Alkanole eine Gerade (s. Abb. 47).

Wie aus Abbildung 46 bzw. Tabelle 12 ersichtlich, bilden Docosanol-1 (17 %), Tetracosanol-1 (33 %) und Triacontanol-1 (12 %) die Hauptkomponenten in dem Alkanolgemisch der

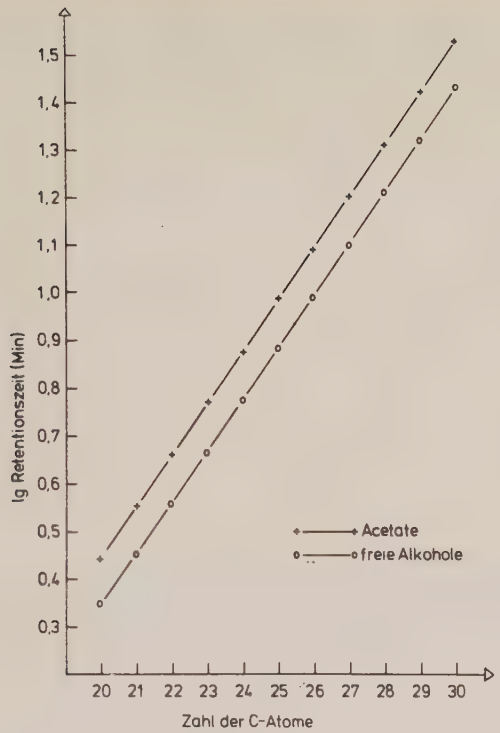


Abbildung 47 : Retentionszeit (lg) der homologen Reihe der n-Alkohole und ihrer Acetate in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge

C-Zahlen 20 bis 30. Insgesamt dominieren die n-Alkanole mit gerader Kohlenstoffzahl, was im Einklang mit den Literaturangaben von anderen Pflanzen steht (EGLINTON u. HAMILTON, 1967; KOLATTUKUDY, 1970a).

Auch die aus der Esterfraktion durch Hydrolyse in Freiheit

gesetzten Triterpenalkohole waren mit primären aliphatischen Alkoholen vergesellschaftet, so daß diese in den Blättern ebenfalls verestert vorgelegen haben müssen (s. S. 13). Da sich ihre Peaks im GC nicht mit denjenigen der Triterpenalkohole überlagerten, wurde in diesem Falle für ihre gc Identifizierung auf eine vorherige Abtrennung von den Triterpenen verzichtet. Das Ergebnis der ansonsten analog wie bei den frei vorliegenden Alkoholen durchgeführten gc Untersuchung ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 12 : Prozentuale Zusammensetzung der frei und verestert vorliegenden primären aliphatischen Alkohole

Alkohole	Zahl d. C-Atome	RRT* frei	RRT** Acetat	% frei	% Ester
Eicosanol-1	20	0,29	0,27	10	36
Heneicosanol-1	21	0,37	0,35	1	3
Docosanol-1	22	0,47	0,46	17	24
Tricosanol-1	23	0,61	0,59	2	1
Tetracosanol-1	24	0,78	0,76	33	32
Pentacosanol-1	25	1,00	1,00	2	<1
Hexacosanol-1	26	1,30	1,29	8	3
Heptacosanol-1	27	1,70	1,68	2	<1
Octacosanol-1	28	2,20	2,17	7	<1
Nonacosanol-1	29	2,30	2,68	6	<1
Triacontanol-1	30	3,70	3,65	12	<1

* bezogen auf Pentacosanol-1 (RT 7,6 Min.)
** bezogen auf Pentacosanol-1-acetat (RT 9,9 Min.)

In der qualitativen Zusammensetzung treten keine Unterschiede zu den freien Alkanolen auf. Alkanole mit gerader C-Zahl sind auch hier dominierend. Auffällig im Vergleich zu den frei vorliegenden Verbindungen ist der höhere Anteil an Eicosanol-1 und der geringere Anteil an längerkettigen Verbindungen mit den C-Zahlen 26-30.

9. Die sekundären aliphatischen Alkohole

9.1. Isolierung

Im DC des Petrolätherextraktes erschien ein Fleck, bei dem es sich aufgrund der Laufhöhe um sekundäre aliphatische Alkohole handeln konnte (s. Abb. 1,S. 14). Bei der SC des Petrolätherextraktes fiel diese Komponente in der Fraktion C an (s. Tab.25,S. 185). Der hRf-Wert von 33 im Fließmittel Benzol (System XI) stimmte mit dem von KOLATTUKUDY (1970b) sowie HOLLOWAY und Mitarb. (1976) angegebenen Wert (hRf 32) für sekundäre aliphatische Alkohole überein (s. auch Abb. 48).

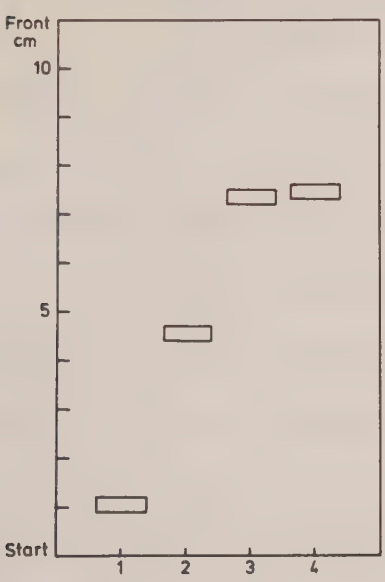


Abbildung 48 : DC der sekundären aliphatischen Alkohole und ihrer Derivate (DC-System XI)

1 : prim. aliph. Alkohole als Vergleich
2 : isolierte sek. aliph. Alkohole
3 : daraus hergestellte Ketone
4 : acetylierte sek. aliph. Alkohole

Detektion: Verkohlung mit konz. H_2SO_4

Zur Isolierung dieser Komponente wurden 265 mg der Fraktion C an Kieselgel mit Petroläther/Benzol (35 : 65, v : v) chromatographiert. Hierbei fielen 153 mg einer Substanz an, die sich in den DC-Systemen I, II, X und XI nach Detektion mit konz. Schwefelsäure als rein erwies (s. Exp. Teil, S. 193).

9.2. Identifizierung

Die aus Äthanol nadelförmig kristallisierende, weiße Substanz hatte einen Schmelzpunkt von 78-80°C, der auf sekundäre aliphatische Alkanole hindeutete (PURDY u. TRUTER, 1963: 80,2-81°C; MATSUO und Mitarb., 1972: 77-78°C).
Die gefundenen Werte der CH-Analyse (C: 81,5 % und H: 14,1 %) wiesen auf Nonacosanol, $C_{29}H_{59}OH$, hin (C: 82 %, H: 14,2 %; vgl. auch PURDY u. TRUTER, 1963: C: 81,7 %, H: 13,9 %).
Das IR-Spektrum (s. Abb. 49c, S. 99) zeigte neben den von den Kohlenwasserstoffen her bekannten Absorptionsbanden der Methyl- und Methylengruppen (2920, 2850, 1465, 1380 und 720 cm^{-1}) die für die freie OH-Gruppe typische breite Absorptionsbande zwischen 3200-3500 cm^{-1}. Auf den sekundären Charakter der OH-Gruppe wiesen die in dem Fingerprint-Bereich auftretenden Kopplungsschwingungen bei 1130, 1110, 1090, 1065, 1040 und 1025 cm^{-1} hin (VAN DER MAAS, 1969; WILLIAMS u. FLEMING, 1975). Das Spektrum zeigte damit die in der Literatur für sekundäre Alkanole angegebenen Banden (vgl. u.a. MACEY u. BARBER, 1970; KOLATTUKUDY, 1970b; MATSUO und Mitarb., 1972).
Das Vorliegen einer freien OH-Gruppe wurde durch die Bildung eines Acetats bestätigt (s. Abb. 48). Die Oxidierbarkeit zum Keton mit CrO_3 bewies ihren sekundären Charakter (s. Exp. Teil,

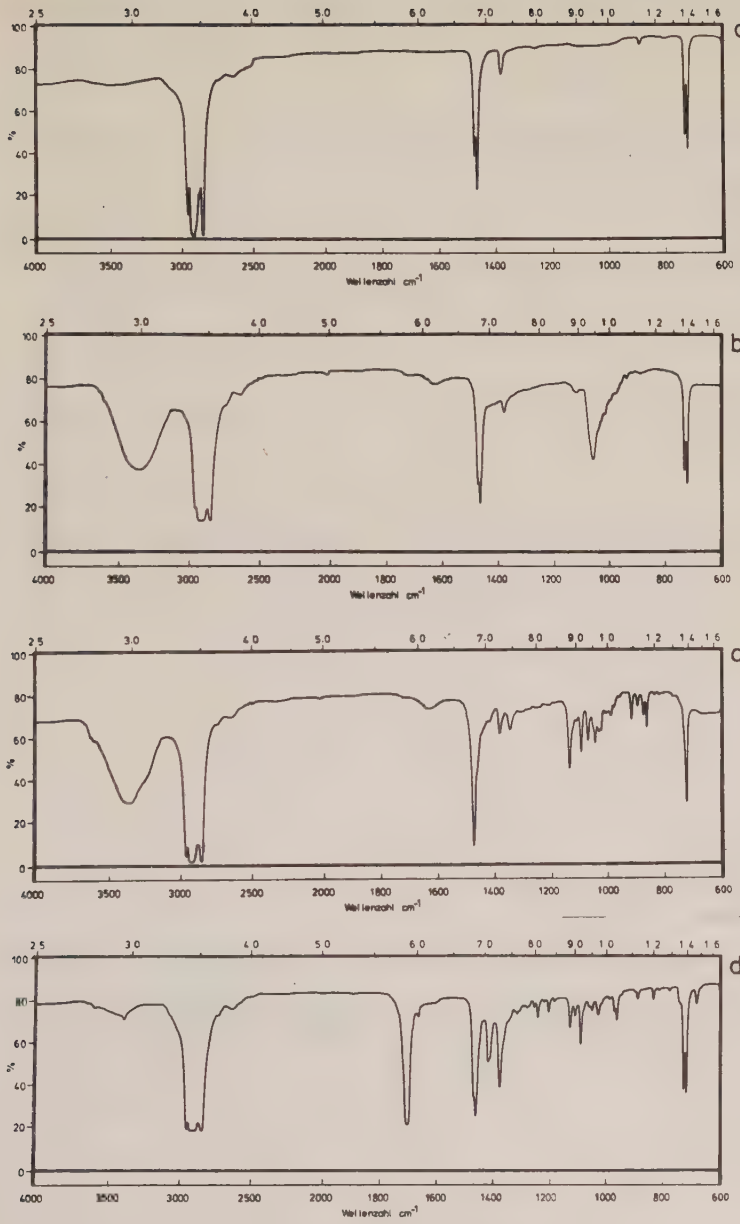


Abbildung 4§ a-d : IR-Spektren der isolierten Alkane (a), primären aliphatischen Alkohole (b), sekundären aliphatischen Alkohole (c) sowie der hergestellten Ketone (d)

S. 193). Die Ketobande erschien im IR-Spektrum bei 1700 cm^{-1} (s. Abb. 49d). Die dc einheitlichen Ketone (s. Abb. 48) schmolzen bei 68-71°C (PURDY u. TRUTER, 1963: 75°C; MATSUO und Mitarb., 1972: 70-71°C).

Damit war das Vorliegen sekundärer aliphatischer Alkohole bewiesen, die aufgrund der negativen Tetranitromethan-Reaktion gesättigt sein mußten.

Gesättigte sekundäre Alkanole lassen sich gc an einer SE-30-Säule auftrennen (MACEY u. BARBER, 1970; BLOMQUIST und Mitarb., 1972). Im GC (s. Abb. 50) erschien ein Hauptpeak (RRT bezogen auf Cholesterin 1,01), der 99,5 % der Alkanolzusammensetzung ausmachte. Weitere Alkanole traten lediglich

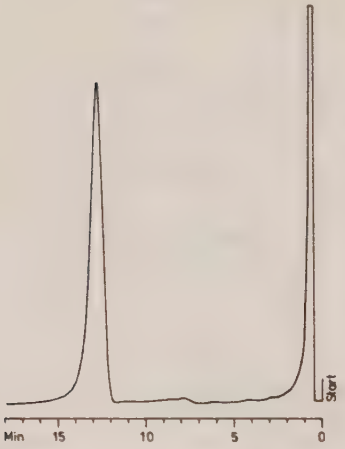


Abbildung 50 : GC der isolierten sekundären aliphatischen Alkohole (Säule: 3 % Silikongummi SE-30, System I)

in geringen Spuren auf. Da keine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, war eine Zuordnung nicht möglich. Eine indirekte Identifizierung bot sich jedoch durch eine Reduktion

zu den entsprechenden Paraffinen (vgl. WOLLRAB, 1969; MATSUO und Mitarb., 1972) und deren gc Analyse an. Die nach Reduktion mit Zinkstaub und Salzsäure (s. Exp.,Teil S. 194) erhaltene Substanz erwies sich nach DC und IR-Spektrum als reines Paraffin. Im GC an der SE-30-Säule erschien als Hauptpeak n-Nonacosan (99,5 %). In Spuren von 0,1 % und weniger traten daneben Alkane der C-Zahlen 20-31 auf.

Danach handelte es sich bei dem gesättigten sekundären aliphatischen Alkohol um Nonacosanol ($C_{29}H_{59}OH$), der nur von Spuren weiterer sekundärer aliphatischer Alkohole der C-Zahlen 20-31 begleitet wurde. Nonacosanol dominiert oft in pflanzlichen sekundären Alkanolen (vgl. auch WOLLRAB, 1969; KOLATTUKUDY, 1970a).

Über die Position der sekundären alkoholischen OH-Gruppe konnte nach den bisherigen Analysen keine Aussage gemacht werden. Ihre Stellung im Molekül läßt sich jedoch durch das Massenspektrum bestimmen (s. Abb. 51). Wegen der leichten Dehydratisierung

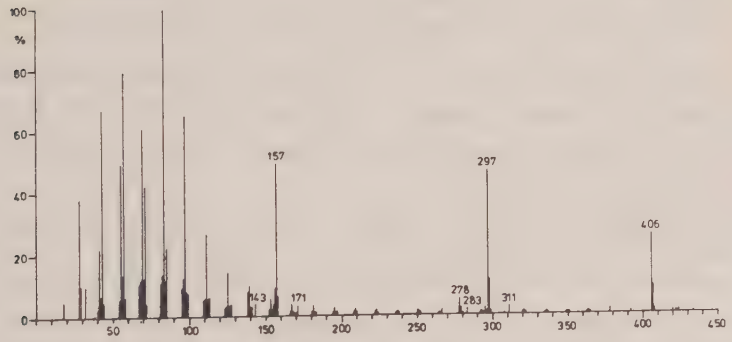


Abbildung 51 : Massenspektrum der sekundären aliphatischen Alkohole

von Alkoholen zu Olefinen trat hier der Molekülpeak (M^+: 424) nur in sehr geringer Intensität auf, im Gegensatz zum Fragment m/e 406, das durch Abspaltung von Wasser entsteht. Die intensiven Peaks bei m/e 297 und m/e 157, die durch Bruch der zur OH-Gruppe benachbarten C-C-Bindungen entstehen, zeigen, daß ein unsymmetrischer Alkohol vorliegt (FRIEDEL und Mitarb., 1956; SPITELLER, 1966). Aufgrund dieser Spaltprodukte und der Fragmente m/e 279 und 278, deren Entstehung in Tabelle 13 gezeigt wird, liegt als Hauptkomponente 10-Nonacosanol vor (vgl. BERI u. LEMON, 1970). Die Fragmente m/e 311, 293, 292 und 143 sowie 283, 265, 264 und 171, die analog wie bei 10-Nonacosanol entstehen, sprechen dafür, daß daneben auch die Isomeren 9-Nonacosanol bzw. 11-Nonacosanol auftreten. Aus der Intensität der Fragmente geht hervor, daß 9-Nonacosanol 5,8 %, 11-Nonacosanol 3,6 % und 10-Nonacosanol 90,1 % des Isomerengemisches stellen.

Neben den Isomeren von Nonacosanol wird durch die in geringer Intensität auftretenden Fragmente m/e 434, 420, 392, 378, 364, 350, 336, 322, 308, 294 und 280 die Anwesenheit der in Spuren vorkommenden Alkanole der C-Zahl 20-31 bestätigt. Bei diesen Fragmenten handelt es sich um M^+-H_2O-Spaltprodukte. Eine Positionsbestimmung der OH-Gruppe im Molekül war wegen der zu geringen Konzentration dieser Verbindungen in dem Gemisch nicht möglich.

Die Analysen lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß es sich bei den frei vorliegenden sekundären Alkanolen um 9-Nonacosanol (5,8 %), 10-Nonacosanol (90,1 %) und 11-Nonacosanol (3,6 %) sowie Spuren von Alkanolen mit den C-Zahlen

20-31 (zusammen 0,5 %) handelt. Nach der präparativen Ausbeute von 0,37 %, bezogen auf das Blatt-Trockengewicht (entsprechend 11 % des Petrolätherextraktes), bilden sie eine Hauptkomponente der petrolätherlöslichen Lipide (3,29 % bezogen auf das Blatt-Trockengewicht) (vgl. auch HOLLOWAY und Mitarb., 1976).

Tabelle 13 : Fragmentierung der Isomeren von Nonacosanol

10 - Nonacosanol		
$424^+ \rightarrow 297^+ + C_9H_{19}$	$C_{19}H_{39} - \overset{+}{C}(OH) - H$	m/e 297
$297^+ \rightarrow 279^+ + H_2O$		
$279^+ \rightarrow 278^+ + H$		
$424^+ \rightarrow 157^+ + C_{19}H_{39}$	$C_9H_{19} - \overset{+}{C}(OH) - H$	m/e 157
9 - Nonacosanol		
$424^+ \rightarrow 311^+ + C_8H_{17}$	$C_{20}H_{41} - \overset{+}{C}(OH) - H$	m/e 311
$311^+ \rightarrow 293^+ + H_2O$		
$293^+ \rightarrow 292^+ + H$		
$424^+ \rightarrow 143^+ + C_{20}H_{41}$	$C_8H_{17} - \overset{+}{C}(OH) - H$	m/e 143
11 - Nonacosanol		
$424^+ \rightarrow 283^+ + C_{10}H_{21}$	$C_{18}H_{37} - \overset{+}{C}(OH) - H$	m/e 283
$283^+ \rightarrow 265^+ + H_2O$		
$265^+ \rightarrow 264^+ + H$		
$424^+ \rightarrow 171^+ + C_{18}H_{37}$	$C_{10}H_{21} - \overset{+}{C}(OH) - H$	m/e 171

II. Isolierung und Identifizierung lipophiler Substanzen aus dem Aceton-Extrakt entfetteter Blätter

1. Nachweis glykosidisch gebundener Sterine

Sterine können in der Pflanze frei, verestert und als hydrophile Steringlykoside sowie Acylsteringlykoside vorliegen (vgl. u.a. KÖSTENS u. WILLUHN, 1973; GRUNWALD, 1975; WILLUHN u. RICHTER, 1977; JANISZOWSKA und Mitarb., 1979).

Um zu prüfen, ob hydrophile Sterinderivate auch in den Blättern von S. albus vorkommen, wurden die Blätter durch erschöpfende Petrolätherextraktion von den freien und veresterten Sterinen befreit und anschließend mit Aceton ausgezogen (Ausbeute 8,4 % bezogen auf das Blatt-Trockengewicht; s. Exp. Teil, S. 194).

Nach saurer Hydrolyse des Acetonextraktes (s. Exp. Teil, S. 194) und DC-Analyse des unverseifbaren Anteils (= 0,6 % vom Blatt-Trockengewicht) waren im DC-System I Sterine, nicht aber Triterpene und Methylsterine nachweisbar. Zu ihrer Isolierung wurde der unverseifbare Anteil an Kieselgel wiederholt sc aufgetrennt (s. Exp. Teil, S. 195). Danach lagen 50 mg eines in den DC-Systemen I und III einheitlichen Steringemisches vor, das mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz die für Δ^5-Sterine charakteristische Färbung zeigte. Der Schmelzpunkt (131-133°C) und das IR-Spektrum stimmten mit den aus dem Petrolätherextrakt isolierten freien Sterinen überein.

Die gc Untersuchung der freien Sterine und ihrer Acetylderivate an der OV-17-Säule ergab, daß in dem Gemisch Cholesterin, Campesterin und/oder 24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin und Isofucosterin vorlagen.

Um zu überprüfen, ob Campesterin und/oder 24-Methylencholesterin in dem Steringemisch vorlagen, die auf der OV-17-Säule ein "kritisches Paar" bilden, wurden die Sterinacetate an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelfolien im DC-System V aufgetrennt. Neben dem Hauptfleck, der auf gleicher Höhe wie ein Gemisch aus den Acetaten von Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin und ß-Sitosterin lag, trat im DC nur noch ein sehr schwacher Fleck auf der Höhe von mitchromatographiertem Isofucosterinacetat auf. 24-Methylencholesterin konnte unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Das gleichzeitige Vorkommen von Clerosterin und Isofucosterin wurde gc nicht mehr überprüft.

Tabelle 14 : Quantitative Zusammensetzung der frei, verestert und glykosidisch vorliegenden Sterine aus den Blättern von S. albus

Sterin	Anteil in %		
	frei	verest.	glykos.
Cholesterin	1	2	1
Campesterin/24-Methylencholesterin	15	17	14*
Stigmasterin	2	<1	3
ß-Sitosterin/Clerosterin	82	76	82
Isofucosterin	1	4	<1

* nur Campesterin

Nach der dc und gc Analyse führen die Blätter von S. albus mit Ausnahme von 24-Methylencholesterin dieselben Sterine auch in Form hydrophiler Derivate, wie sie im Petrolätherextrakt frei und verestert nachgewiesen wurden. Auch in der quantitativen Zusammensetzung sind praktisch keine Unterschiede vorhanden (s. Tab. 14).

2. Die Steringlykoside und Acylsteringlykoside

2.1. Nachweis und Isolierung

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, daß die Blätter von S. albus hydrophile Sterinderivate führen. Bei den isolierten Sterinen mußte es sich um die Aglyka von Steringlykosiden und/oder Acylsteringlykosiden handeln. Diese lassen sich dc nach EICHENBERGER u. GROB (1970) im System XIII nachweisen. Als Vergleichssubstanzen standen von KÖSTENS u. WILLUHN (1973) aus Solanum dulcamara isolierte Acylsteringlykoside und Steringlykoside zur Verfügung. Im DC traten in Laufhöhe dieser beiden Substanzen (hRf 41: Steringlykoside; hRf 73: Acylsteringlykoside) zwei Flecke auf, die sich mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz in der für Δ^5-Sterine typischen Weise anfärbten. Die Isolierung dieser beiden Substanzen erfolgte mittels präparativer Dickschichtchromatographie aus 6 g Acetonextrakt im gleichen Fließmittel und anschließender Reinigung über Kieselgelfolien (s. Exp. Teil,S. 195). Hiernach fielen 17,6 mg Steringlykoside an, die nach Umkristallisation aus Methanol bei 260-262°C schmolzen (Lit. KÖSTENS u. WILLUHN,

1973: 253-254°C) und 11,9 mg Acylsteringlykoside mit dem Schmelzpunkt von 130-133°C (KÖSTENS u. WILLUHN, 1973: 143-144°C bei Solanum dulcamara).

Das IR-Spektrum der Steringlykoside zeigte eine breite OH-Bande bei 3100 bis 3600 cm^{-1}, die für glykosidische Bindungen typische breite Schwingung zwischen 1150 und 1000 cm^{-1} sowie die für die Sterine charakteristischen CH-Schwingungen bei 2960-2860, 1470 und 1380 cm^{-1}. Das Spektrum stimmte mit den in der Literatur angegebenen Banden für Steringlykoside überein (vgl. LEPAGE, 1964).

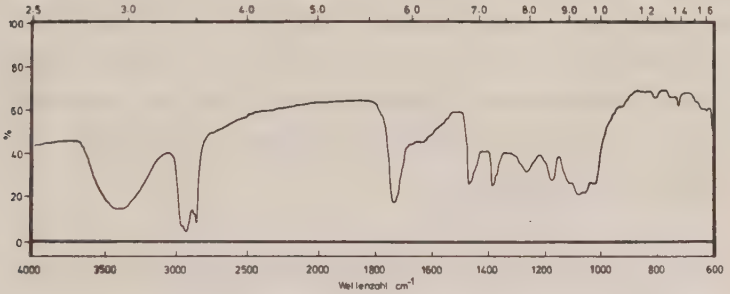


Abbildung 52 : IR-Spektrum der isolierten Acylsteringlykoside

Das IR-Spektrum der Acylsteringlykoside (s. Abb. 52) zeigte neben den bei den Steringlykosiden auftretenden Schwingungen eine starke Esterbande bei 1740 cm^{-1} und war identisch mit den für Acylsteringlykoside angegebenen Absorptionen (vgl. LEPAGE, 1964; KÖSTENS u. WILLUHN, 1973).

2.2. Identifizierung der Acylsteringlykoside

2.2.1. Die Säurekomponente

Zur Identifizierung der sauren Komponente wurden 7,8 mg der isolierten Acylsteringlykoside alkalisch verseift (s. Exp. Teil,S. 196). Durch Ausschütteln mit Chloroform wurden 4,2 mg einer Substanz erhalten, die dc mit dem isolierten Steringlykosid übereinstimmte und nach Umkristallisation aus Methanol mit 262-265°C den gleichen Schmelzpunkt wie dieses aufwies. Anschließend wurde das Hydrolysat auf pH 1-2 gebracht und die frei gesetzte Säure mit Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt (Ausbeute 2 mg). Die Identifizierung der Säure erfolgte gc an einer DEGS-Säule als Methylester. Im GC erschien nur ein Peak, der mit dem von authentischem Palmitinsäuremethylester übereinstimmte. Bei der Säurekomponente der isolierten Acylsteringlykoside handelt es sich somit um Palmitinsäure.

2.2.2. Die Aglyka und die Zuckerkomponente der Acylsteringlykoside

Zum Nachweis der Aglyka und der Zuckerkomponente wurde das nach alkalischer Hydrolyse erhaltene Steringlykosid (4,2 mg) sauer verseift (s. Exp. Teil,S. 196). Die Aglyka wurden dem Hydrolysat mit Petroläther entzogen. Sie zeigten im DC-System I gleiches Laufverhalten und gleiche Färbung mit Molybdatophosphorsäure wie ein Gemisch aus Cholesterin, Campesterin und ß-Sitosterin. Die gc Analyse (OV-17-Säule) ergab, daß es sich um ein Gemisch aus Cholesterin, Campesterin,

Stigmasterin, ß-Sitosterin und Isofucosterin handelte.

Zur Identifizierung des Zuckeranteils wurde das saure Hydrolysat mit stark basischem Ionenaustauscher neutralisiert und eingeengt. Die DC-Analyse auf Kieselgur G-Schichten nach WALDI (1965) (System XII) führte zur Identifizierung des Zuckers als Glucose (s. Abb. 53).

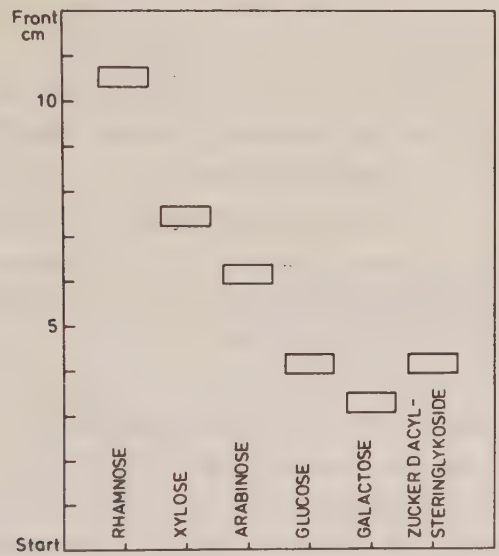


Abbildung 53 : DC der Zuckerkomponente der Acylsteringlykoside aus den Blättern von S. albus (System XII, Detektion: Anisaldehyd-H_2SO_4)

Zur gc Identifizierung wurde anschließend der Zucker mit Natriumborhydrid reduziert und der Zuckeralkohol acetyliert. Im GC an der OV-225-Säule trat nur ein Peak auf, der mit

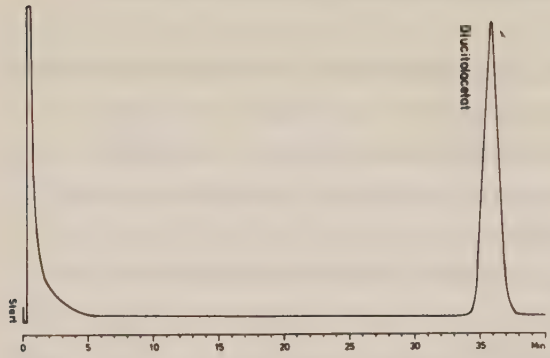


Abbildung 54 : GC des in das Alditolacetat überführten Zuckers der Acylsteringlykoside (Säule: 3 % Silikonöl OV-225, System V)

dem von authentischem Glucitolacetat übereinstimmte (JANSSON und Mitarb., 1976) (s. Exp. Teil, S. 182).

Bei den isolierten Acylsteringlykosiden handelt es sich somit um ein Gemisch aus den Palmitinsäureestern von Cholesterin-, Campesterin-, Stigmasterin-, ß-Sitosterin- und Isofucosteringlucosid (vgl. auch ELBEIN u. FORSEE, 1975; GRUNWALD, 1978).

2.3. Identifizierung der Steringlykoside

Die Identifizierung der Zuckerkomponente und der Aglyka aus den Steringlykosiden wurde nach saurer Hydrolyse analog wie bei den Acylsteringlykosiden durchgeführt. Als Zuckerkomponente wurde erwartungsgemäß Glucose gefunden, das Steringemisch setzte sich aus Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin,

ß-Sitosterin und Isofucosterin zusammen. Die Steringlykoside stellen demnach Glucoside von Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin und Isofucosterin dar.

3. Die Triterpensäuren

3.1. Isolierung von Oleanolsäure, Ursolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure

In der Literatur wird mehrfach über das gleichzeitige Vorkommen von α- und/oder ß-Amyrin und seinen Säurederivaten, der Ursolsäure bzw. Oleanolsäure, berichtet (vgl. u.a. HUNECK u. SNATZKE, 1965a; AGARWAL u. RASTOGI, 1974; WILLUHN u. RICHTER, 1977; BANDARANAYAKE und Mitarb., 1977). Da im Petrolätherextrakt der Schneebeere α- und ß-Amyrin nachgewiesen werden konnten, wurde der Acetonextrakt auf die entsprechenden Säuren hin untersucht. Hier trat im DC-System XIII neben den bereits beschriebenen Steringlykosiden und Acylsteringlykosiden in Laufhöhe von mitchromatographierter Ursol-/Oleanolsäure, die sich dc nicht trennen lassen, eine LIEBERMANN-BURCHARD-positive Substanz auf (s. Abb. 55a). Im DC-System XIV (Toluol/Aceton, 7 : 3, nach HÄNSEL u. KUSSMAUL, 1975) traten zusätzlich zwei sich violett färbende Flecke auf, von denen einer mit dem von 2α-Hydroxyursolsäure* übereinstimmte (s. Abb. 55b).

---

* Für die Überlassung der Vergleichssubstanz danke ich Herrn Dr. R. P. Rastogi, Central Drug Research Institute, Lucknow (Indien).

Abbildung 55 a-b : DC des Acetonextraktes und der identifizierten Substanzen

(I: DC-System XIII - Chloroform/Methanol, 6 : 1;

II: DC-System XIV - Toluol/Aceton, 7 : 3)

1 : Steringlykoside
2 : Acylsteringlykoside
3 : 2α-Hydroxyursolsäure
4 : Oleanolsäure
5 : Ursolsäure
6 : Acetonextrakt

Zur Isolierung dieser Komponenten wurden 12 g Acetonextrakt an Kieselgel sc mit Chloroform und Chloroform/Methanol-Gemischen fraktioniert (s. Exp. Teil, S. 197). Nach weiterer Reinigung wurden 100 mg einer in den DC-Systemen XIII, XIV und XV einheitlichen und mit Ursol- und Oleanolsäure übereinstimmenden Substanz sowie 83 mg der dc mit 2α-Hydroxyursolsäure identischen Verbindung erhalten.

3.2. Identifizierung von Ursolsäure und Oleanolsäure

Die isolierte Substanz kristallisierte aus Äthanol in Form feiner Nadelbüschel, die bei 220°C sublimierten und bei 260-263°C schmolzen. Dieser Wert lag unter dem in der Literatur für Ursolsäure angegebenen Schmelzpunkt (HÄNSEL u. KUSSMAUL, 1975: 285-286°C; WILLUHN u. RICHTER, 1977: 281-283°C). Da Ursolsäure häufig von mehr oder weniger großen Mengen der sc und dc nicht abtrennbaren Oleanolsäure (Schmp. 310°C, HALSALL u. APLIN, 1964) begleitet wird, sind die Schmelzpunkte starken Schwankungen unterworfen und wenig charakteristisch (s. AUF DEM KELLER und Mitarb., 1970). Das IR-Spektrum des isolierten Kristallisats (s. Abb. 56) stimmte mit dem Vergleichsspektrum eines Gemisches von Ursol- und Oleanolsäure überein (vgl. auch SNATZKE und Mitarb., 1962). Es zeigte die breite Bande der OH-Valenzschwingung zwischen 3300 und 3500 cm^{-1}, die durch die Carboxylgruppe bedingte -C=O-Valenzschwingung bei 1695 cm^{-1}, die Banden bei 1389, 1379, 1361, 1307, 1274 und 1250 cm^{-1} sowie die für trisubstituierte Doppelbindungen typische Absorption bei 833 und 812 cm^{-1}.

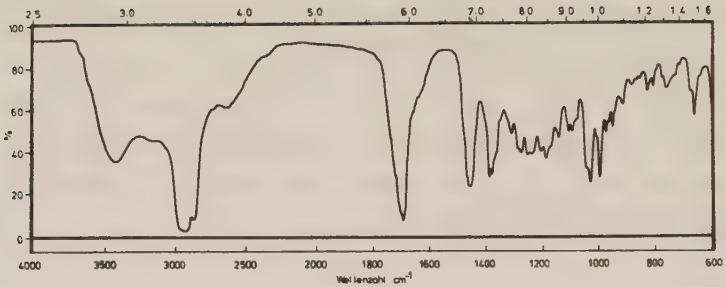


Abbildung 56 : IR-Spektrum der isolierten Ursol- und Oleanolsäure

Der niedrige Schmelzpunkt sprach für das Vorliegen eines Ursol-/Oleanolsäure-Gemisches. Beide Verbindungen lassen sich in Form ihrer Methylester gc trennen. Daher wurde das Kristallisat methyliert (IR-Spektrum: Esterbande bei 1730 cm^{-1}, vgl. MARCO und Mitarb., 1978) und an der OV-17-Säule gc untersucht. Im GC erschienen zwei Peaks (s. Abb. 57), die im direkten Vergleich als Ursol- und Oleanolsäuremethylester identifiziert wurden (RRT bezogen auf Cholesterin 3,74 bzw. 3,24).

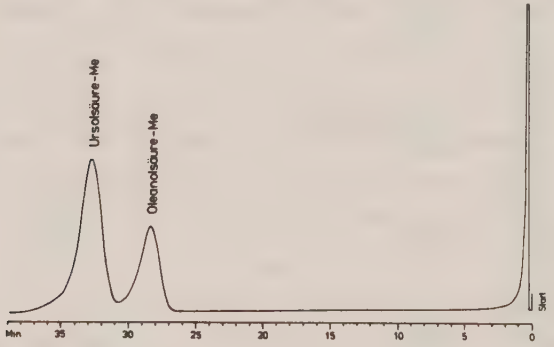


Abbildung 57 : GC der Ursol- und Oleanolsäure in Form ihrer Methylester
(Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

Das Verhältnis Ursolsäure/Oleanolsäure betrug 2:1 (Ursolsäure 65,7 %; Oleanolsäure 34,3 %).

Zur weiteren Identifizierung wurde das Säuren-Gemisch ms untersucht. Das Massenspektrum zeigte die für diese Verbindungen geforderte Molmasse von 456 und die für Δ^{12}-ungesättigten

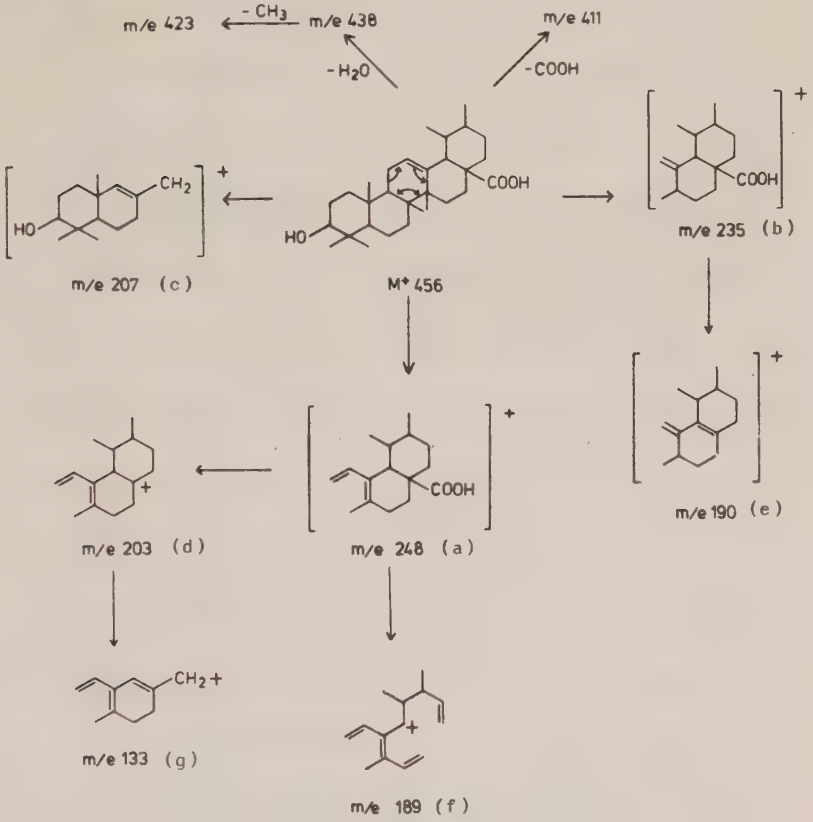


Abbildung 58 : Zerfallsschema für Δ^{12}-ungesättigte Ursane und Oleanane am Beispiel der Ursolsäure

Ursane und Oleanane typischen Schlüsselbruchstücke. Bedingt durch die Δ^{12}-Doppelbindung entsteht durch eine Retro-Diels-Alder-Spaltung das Bruchstück m/e 248, aus dessen weiteren Zerfall die charakteristischen Fragmente m/e 203, 189 und 133 resultieren. Daneben treten die Spaltprodukte m/e 235 und 207 auf. Der Verlust der Carboxylgruppe führt von Fragment m/e 235 zum Bruchstück m/e 190 (vgl. BUDZIKIEWICZ und Mitarb., 1963; AUF DEM KELLER und Mitarb., 1970). Die Fragmentierung ist in Abbildung 58 wiedergegeben (s. auch Tab. 15).
Zum getrennten Nachweis der im Gemisch vorliegenden isomeren Ursol- und Oleanolsäure wurden ihre Methylester einer GC/MS-Analyse zugeführt (OV-101-Säule). Die beiden Massenspektren lieferten gleiche Fragmente, deren Intensitäten sich jedoch teilweise unterschieden (s. Abb. 59 u. 60).
Die einzelnen Spaltprodukte der Methylester entstehen analog wie bei den freien Verbindungen. Durch die zusätzliche Methylgruppe kommt es nur zu einer Verschiebung einzelner Fragmente (s. Tab. 15). Auffällig ist das unterschiedliche Verhältnis der Intensitäten der Fragmente m/e 262 zu m/e 203 bei beiden Verbindungen. Bedingt durch die geminale Stellung der Methylgruppen an C_{20} kommt es bei der Oleanolsäure zu einer leichteren Abspaltung der methylierten Carboxylgruppe vom Fragment m/e 262 unter Bildung von m/e 203 und somit zu einer höheren Intensität als beim Ursolsäuremethylester, bei dem die beiden Methylgruppen an C_{19} und C_{20} stehen. Aufgrund des Verhältnisses der Intensitäten von m/e 262 : m/e 203 können somit die beiden isomeren Verbindungen ms unterschieden werden (Oleanolsäure 1:2, Ursolsäure 1:1; vgl. auch

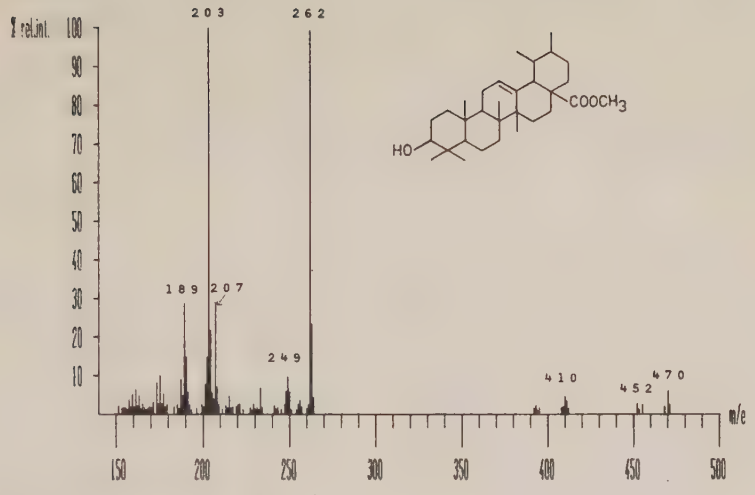


Abbildung 59 : Massenspektrum von Ursolsäuremethylester

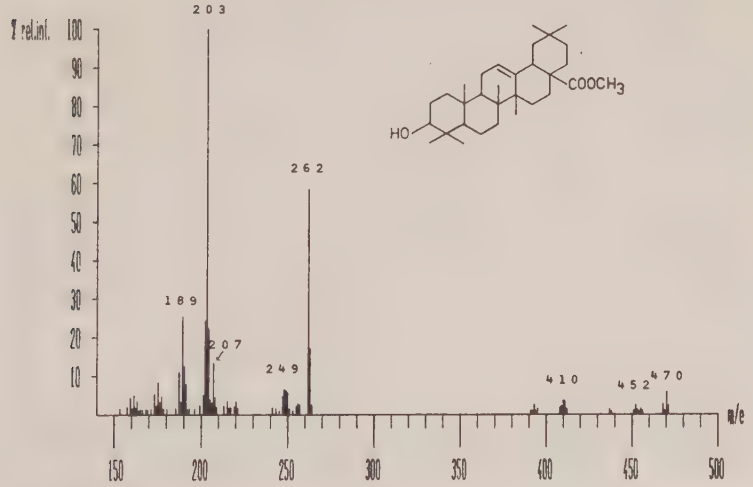


Abbildung 60 : Massenspektrum von Oleanolsäuremethylester

THOMAS u. WILLHALM, 1964; GRILANC u. MILIVOJEVIĆ, 1973). Die Fragmentierung stimmte mit der von authentischen Vergleichsspektren überein (vgl. u.a. HUNECK u. SNATZKE, 1965a; MARCO und Mitarb., 1978). Somit handelt es sich bei den isolierten Triterpensäuren um Oleanolsäure und die isomere Ursolsäure.

3.3. Identifizierung der 2α-Hydroxyursolsäure

Die dc in den Systemen XIII, XIV und XVI mit der aus Viburnum erubescens isolierten 2α-Hydroxyursolsäure übereinstimmende Verbindung (s. Abb. 62) schmolz nach Umkristallisation aus Methanol bei 245-247°C (GLEN und Mitarb., 1967: 256-260°C; AGARWAL u. RASTOGI, 1974: 242-245°C; BANDARANAYAKE und Mitarb., 1977: 249°C).

Das IR-Spektrum (s. Abb. 61) stimmte mit dem zum Vergleich aufgenommenen Spektrum von 2α-Hydroxyursolsäure überein (3600-3200 cm^{-1}: OH-Schwingung; 1690 cm^{-1}: Carboxylgruppe; 1390-1355 cm^{-1} und 1330-1245 cm^{-1}: typische Schwingungen für Ursolsäurederivate; vgl. auch SNATZKE und Mitarb., 1962).

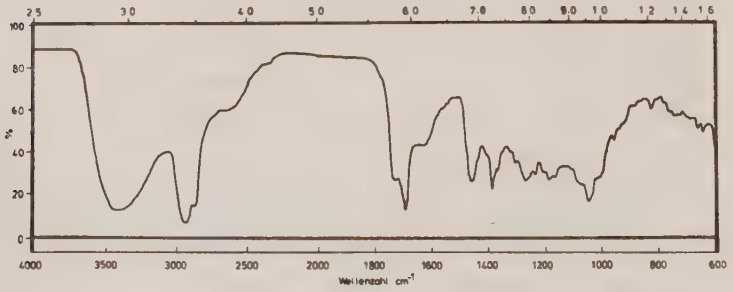


Abbildung 61 : IR-Spektrum der isolierten 2α-Hydroxyursolsäure

Von der in Sambucus nigra vorkommenden 20ß-Hydroxyursolsäure (Schmelzpunkt: 210-212 °C) unterschied sich die Verbindung bereits durch ihren Schmelzpunkt (HÄNSEL u. KUSSMAUL, 1975). Die beiden isomeren Hydroxyursolsäuren* konnten darüber hinaus in den DC-Systemen XIV und XVI aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufhöhen differenziert werden.

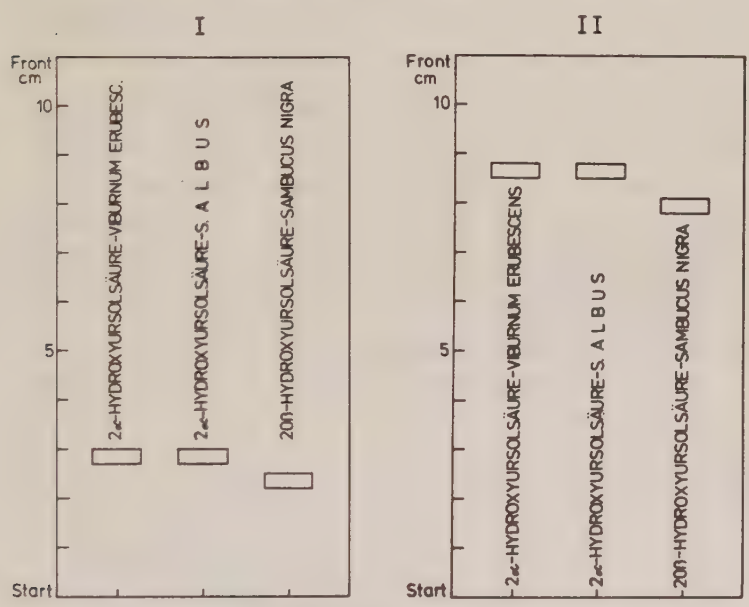


Abbildung 62 : DC der isolierten 2α-Hydroxyursolsäure und der 20ß-Hydroxyursolsäure (I: DC-System XIV, II: DC-System XVI)

---

* Herrn Prof. Dr. R. Hänsel, Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin danke ich für die Überlassung von 20ß-Hydroxyursolsäure.

Die MS-Fragmentierung der isolierten Verbindung stimmte mit der in der Literatur für 2α-Hydroxyursolsäure angegebenen überein (GLEN und Mitarb., 1967; BRIESKORN u. KAPADIA, 1980). Die Fragmente m/e 454 und m/e 436 entstehen durch die Abspaltung von je einem Molekül H_2O. Die Bruchstücke m/e 248 und 203 resultieren aus einer Retro-Diels-Alder-Spaltung und sind für pentacyclische Triterpene mit einer Δ^{12}-Doppelbindung charakteristisch (s. DJERASSI und Mitarb., 1962; BUDZIKIEWICZ und Mitarb., 1963). Die Lage der zweiten OH-Gruppe in den Ringen C, D und E kann durch das Vorliegen des Fragmentes m/e 248 ausgeschlossen werden (s. Abb. 64). Das Bruchstück m/e 223 zeigt, daß die OH-Gruppe entweder im Ring A oder B lokalisiert ist. Durch das Auftreten von m/e 60, das für Diole charakteristisch ist, ergibt sich für die zweite OH-Gruppe eine Nachbarstellung zur ersten,

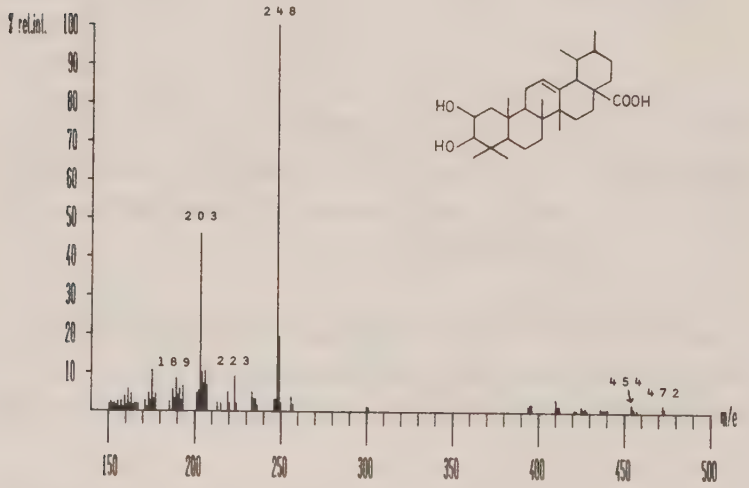
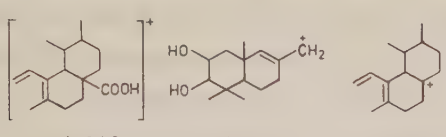


Abbildung 63 : Massenspektrum von 2α-Hydroxyursolsäure

d.h. ihre Position an C-2. (Zur Entstehung der weiteren Fragmente m/e 235, 190, 189 und 133 s. Abb. 58,S. 115).



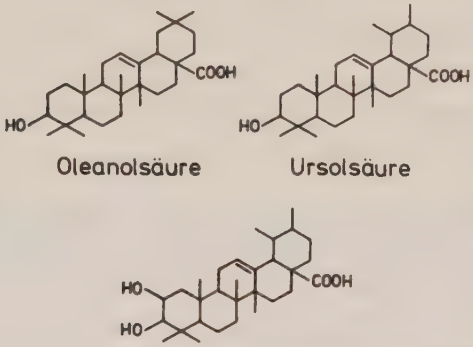
m/e 248 m/e 223 m/e 203

Abbildung 64 : Charakteristische Bruchstücke der 2α-Hydroxyursolsäure

Tabelle 15 : Ergebnisse der MS-Untersuchungen der Triterpensäuren (s. Abb. 58,S. 115)

Fragmente	Ursolsäure-ME	Oleanolsäure-ME	2α-Hydroxyursolsäure
M^+	470 (6%)	470 (6%)	472 (2%)
$M^+ - H_2O$	452 (3%)	452 (2%)	454 (2%)
$M^+ - (H_2O+CH_3)$	437 (<1%)	437 (<1%)	439 (<1%)
$M^+ - 2H_2O$	-	-	436 (<1%)
$M^+ - (2H_2O+CH_3)$	-	-	421 (<1%)
$M^+ - COOH$	-	-	427 (<1%)
$M^+ - COOCH_3$	410 (5%)	410 (4%)	-
a	262 (99%)	262 (59%)	248 (100%)
b	249 (10%)	249 (6%)	235 (3%)
c	207 (29%)	207 (13%)	223 (9%)
d	203 (100%)	203 (100%)	203 (46%)
e	190 (15%)	190 (13%)	190 (4%)
f	189 (29%)	189 (26%)	189 (8%)
g	133 (80%)	133 (32%)	133 (21%)
$C_2H_4O_2$ (Diol)	-	-	60 (12%)

Nach Acetylierung wurde die Substanz erneut ms untersucht. Der Molekülpeak von M^+: 556 und die Abspaltung von zwei Acetatgruppen bestätigten das Vorliegen von zwei OH-Gruppen. Die weitere Fragmentierung verlief analog wie bei der freien Verbindung. Bei der isolierten Substanz handelt es sich somit um 2α-Hydroxyursolsäure.



Oleanolsäure Ursolsäure

2α-Hydroxyursolsäure

Abbildung 65 : Strukturformeln der identifizierten Triterpensäuren

3.4. Nachweis von Ursol-/Oleanolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure in den Kutikularschichten der Blätter

Als Speicherort der Triterpensäuren in der Pflanze werden die äußeren kutinisierten Wandschichten angesehen (KOLATTUKUDY, 1970a). Um zu prüfen, ob dieses auch für die Blätter von S. albus zutrifft, wurden einige Blätter 30 Sekunden lang in Chloroform getaucht, wobei nur Substanzen der Kutikularschicht eluiert werden (vgl. auch CHANG u. GRUNWALD, 1976;

MANHEIM u. MULROY, 1978). Die eingeengte Chloroformlösung wurde anschließend dc in den Systemen XIII und XIV untersucht. Hier traten in den Chromatogrammen Ursol-/Oleanolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure auf. Die Triterpensäuren sind somit auch bei den Blättern der Schneebeere Bestandteile der kutinisierten Wandschichten.

III. Quantitative Bestimmungen

1. Quantitative Bestimmung der Ursolsäure und der Oleanolsäure

Die quantitative Bestimmung der als Ursol- und Oleanolsäure identifizierten Triterpensäuren erfolgte in Form ihrer Methylester auf gaschromatographischem Wege nach der Zumischmethode (vgl. auch RICHTER u. WILLUHN, 1977).

Für die quantitative Bestimmung wurden 25,0 g getrocknete und gemahlene Blätter von S. albus mit Aceton erschöpfend extrahiert (3,19 g Acetonextrakt = 12,8 % des Blatt-Trockengewichtes). Zur Isolierung der Triterpensäuren wurden aliquote Mengen des Extraktes an Kieselgelfolien im DC-System XV chromatographiert, die Triterpensäuren eluiert und methyliert (s. Exp. Teil, S. 198).

Nach Zumischen einer bekannten Menge an Stigmasterinacetat zu den methylierten Triterpensäuren wurde das Gemisch an einer OV-17-Säule aufgetrennt (s. Abb. 66). Aus dem Flächenvergleich der im GC auftretenden Peaks von Ursolsäure- und Oleanolsäuremethylester mit Stigmasterinacetat wurde unter Einbeziehung des Korrekturfaktors nach ACKMAN (1965; s. auch KAISER, 1965) ein Ursolsäuregehalt von 0,22 % und ein Oleanol-

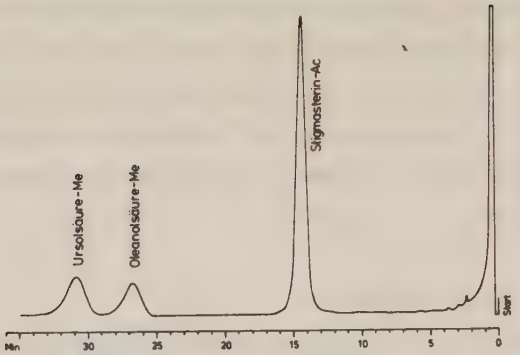


Abbildung 66 : GC der methylierten Triterpensäuren mit Stigmasterinacetat als innerem Standard (Säule: 3 % Silikonöl OV-17, System II)

säuregehalt von 0,18 % ermittelt. Der Isolationsverlust wurde durch Zumischen einer definierten Menge Ursolsäure zum Extrakt mit 7 % bestimmt.

2. Quantitative Bestimmung der Sterine, ihrer Ester und Glykoside

Die qualitativen Analysen hatten ergeben, daß in den Blättern von S. albus die Sterine sowohl frei, verestert als auch glykosidisch gebunden vorliegen. Die quantitative Analyse sollte daher neben dem Gesamtgehalt der Sterine auch den Anteil der freien und gebundenen Sterine am Gesamtgehalt erfassen.

Die Bestimmung erfolgte photometrisch nach dem modifizierten Verfahren von EICHENBERGER u. GROB (1970) unter Verwendung der Farbreaktion mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz (vgl. auch

WILLUHN u. KÖSTENS, 1975; RICHTER u. WILLUHN, 1977).
Zur Aufstellung der Eichkurve wurden die isolierten Sterine aus den Blättern von S. albus herangezogen. Dazu wurden diese, wie später bei der Sterinbestimmung, an Kieselgelfolien chromatographiert (DC-System I). Die Sterinzone wurde mit dem Desaga-Elutor eluiert. Nach Reagenzzugabe (1,00 ml Eisessig + 2,00 ml Essigsäureanhydrid + 0,10 ml konz. Schwefelsäure) wurde das Reaktionsgemisch 30 Min. lang bei 24°C gehalten und danach die Extinktion bei 680 nm gemessen. Im Bereich der gewählten Sterinmengen (0,2-0,8 mg pro Platte und 3,10 ml Reagenz) folgte die Extinktion der gebildeten Farbprodukte dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (Erstellung der Eichkurve und Abbildung 74 s. Exp. Teil, S. 200).
Zur quantitativen Sterinbestimmung wurden zunächst 25,0 g Droge mit Aceton erschöpfend extrahiert. In diesem Extrakt sind neben den freien und veresterten auch die glykosidisch gebundenen Sterine erfaßt (Extrakt A).
In einem zweiten Ansatz wurden 25,0 g Droge zuerst mit Petroläther erschöpfend extrahiert. Hierbei fielen nur die freien und veresterten Sterine an (Extrakt B). Der Drogenrückstand wurde anschließend mit Aceton erschöpfend extrahiert. In diesem Extrakt (Extrakt C) lagen nur die glykosidisch gebundenen Sterine vor.

Extrakt A diente zunächst zur Bestimmung der Gesamtsterine. Ein Teil des Extraktes wurde sauer hydrolysiert und aliquote Teile des unverseifbaren Anteils, wie bei der Erstellung der Eichkurve, über DC-Folien aufgetrennt, die Sterine eluiert

und nach Reagenzzugabe photometrisch vermessen.
Zur gemeinsamen Bestimmung der frei und verestert vorliegenden Sterine wurde ein weiterer Teil von Extrakt A alkalisch verseift und analog weiterbehandelt.
Schließlich wurde ein aliquoter Teil von Extrakt A direkt dc aufgetrennt und nur die Zone der frei vorliegenden Sterine eluiert und photometrisch bestimmt.
Im Acetonextrakt (A) wurden so der Gesamtsteringehalt, der Gehalt an freien Sterinen und der an frei und verestert vorliegenden Sterinen direkt bestimmt. Der Gehalt an verestert und glykosidisch gebunden vorliegenden Sterinen läßt sich daraus jeweils durch die entsprechenden Differenzen ermitteln (s. Tab. 16).
Zur Kontrolle der erhaltenen Werte wurden durch direkte Auftrennung eines aliquoten Teils des Petrolätherextraktes (B) die freien Sterine sowie nach alkalischer Hydrolyse eines weiteren Teils die verestert und die frei vorliegenden Sterine gemeinsam analog bestimmt.
Zur direkten Gehaltsbestimmung der veresterten Sterine wurden darüber hinaus aus einem weiteren Teil des Petrolätherextraktes (B) die freien Sterine mit Digitonin ausgefällt. Nach alkalischer Verseifung des Extraktes wurden die im unverseifbaren Anteil auftretenden Sterine photometrisch bestimmt.
Auch hier lassen sich durch entsprechende Differenz- bzw. Summenbildung aus den ermittelten Gehaltswerten einzelne Analysenwerte überprüfen (s. Tab. 16).
Aus dem Extrakt (C) wurden die glykosidisch gebundenen Sterine direkt bestimmt, indem die nach saurer Hydrolyse anfallenden

Sterine entsprechend photometrisch vermessen wurden.
Aus der Addition des so ermittelten Gehaltes an glykosidisch gebundenen Sterinen und der aus dem Petrolätherextrakt (B) ermittelten Mengen an freien und verestert vorliegenden Sterinen kann zur Kontrolle wieder der Gesamtgehalt berechnet werden.

Bei den jeweiligen Bestimmungen wurden drei Parallelanalysen durchgeführt und die Ergebnisse für die Angabe gemittelt. Die erhaltenen Werte, berechnet als mg pro 100 g Droge, sind in Tabelle 16 zusammengefaßt bzw. in Abbildung 67 graphisch wiedergegeben. Der methodische Fehler wurde durch Zumischen einer definierten Sterinmenge zu den Blättern mit 5 % bestimmt. Die Abweichungen der durch Differenz- bzw. Summenbildung ermittelten Gehaltswerte für die einzelnen Sterinfraktionen von den hierfür direkt ermittelten Werten lagen innerhalb dieser Fehlergrenze.

Tabelle 16 : Ergebnis der Sterin-Gehaltsbestimmungen

Fraktion	Gehalt in mg pro 100 g Droge		
	Aceton-E. (A)	Petroläther-E.(B)	Aceton-E. (C)
Gesamtsterine	129,2	132,1**	
freie Sterine	50,4	51,0	
freie und veresterte Sterine	92,6	89,6	
veresterte Sterine	42,2*	38,6	
glykosidisch gebundene Sterine	36,6*		42,5

* durch Differenzbildung indirekt ermittelte Mengen
** durch Addition der freien und veresterten sowie glykosidisch gebundenen Sterine ermittelt

Der Gesamtsteringehalt in den Blättern von S. albus wurde mit 129 mg pro 100 g Droge (= 0,13 %) ermittelt. Die Hauptmenge entfällt auf die frei vorliegenden Sterine (50,7 mg, entsprechend 39 % der Gesamtsterine). Der Anteil der veresterten Sterine (38,6 mg pro 100 g Droge) und der als Glucoside und Acylglucoside vorliegenden Sterine (39,5 mg pro 100 g Droge) ist mit 30 bzw. 31 % gleich hoch.

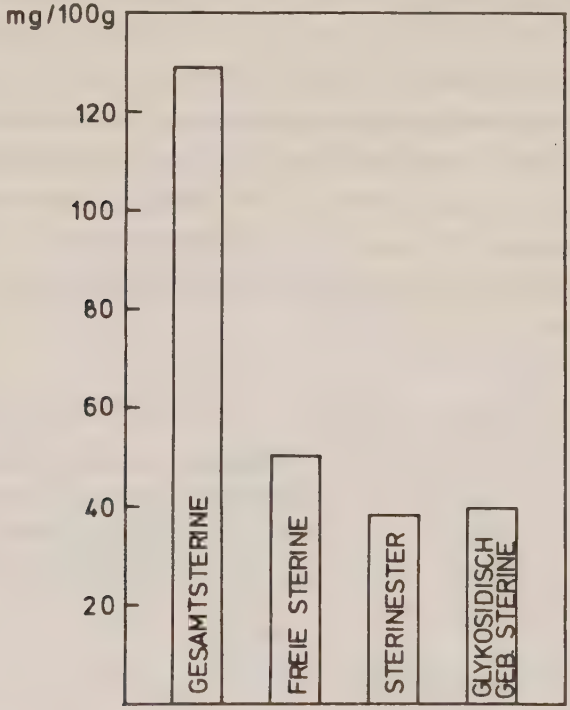


Abbildung 67 : Gehalt der verschiedenen Sterinderivate in den Blättern von S. albus (Mittelwerte)

D. Lipophile Inhaltsstoffe der Früchte von Symphoricarpus albus

I. Isolierung und Identifizierung lipophiler Inhaltsstoffe aus dem Petrolätherextrakt

1. Isolierung

2,26 kg getrocknete Früchte von S. albus wurden mit Petroläther erschöpfend extrahiert. Der erhaltene Extrakt (84,75 g entsprechend 3,75 % vom Fruchttrockengewicht) wurde im DC-System an Kieselgelfolien untersucht. Im Extrakt ließen sich neben freien Sterinen, Methylsterinen, Triterpenen und

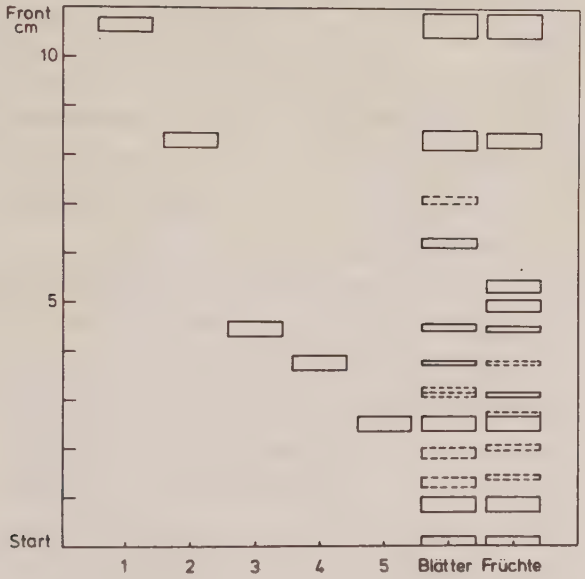


Abbildung 68 : DC des Petrolätherextraktes der Früchte von S. albus (DC-System I)

1 : Fettsäureester der Triterpene, Methylsterine und Sterine
2 : Sekundäre Alkohole
3 : Triterpene
4 : Methylsterine
5 : Sterine

sekundären Alkoholen verestert vorliegende LIEBERMANN-BURCHARD-positive Substanzen nachweisen (s. Abb. 68). Diese Verbindungen wurden analog wie bei den Blättern durch Trockensäulenchromatographie und anschließende sc oder dc Reinigung dc einheitlich gewonnen. Die erhaltene Esterfraktion wurde hydrolysiert und die freigesetzten Triterpene, Methylsterine, Sterine, aliphatischen Alkohole und Fettsäuren wie bei den Blättern beschrieben isoliert (s. Exp. Teil, S. 204ff).

2. Die frei und verestert vorliegenden Triterpene

Die frei vorliegenden und die nach Hydrolyse aus der Esterfraktion erhaltenen Triterpene wurden dc, gc und nach Fraktionierung an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelfolien durch GC/MS-Analyse analog wie die Triterpene der Blätter untersucht (s. Abschnitt 3,S. 16ff). Tabelle 17 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

Die Früchte von S. albus führen danach weitgehend die gleichen Triterpene wie die Blätter. Das dort auftretende tetracyclische Triterpen mit der RRT von 1,26 konnte nicht nachgewiesen werden. Butyrospermol und Lanosta-7,24-dien-3ß-ol wurden nur in der Esterfraktion identifiziert.

Aufgrund der präparativen Ausbeuten (verestert: 0,0014 %, frei: 0,00064 %, bezogen auf das Trockengewicht) darf angenommen werden, daß der größere Teil der Triterpene verestert vorliegt.

Tabelle 17 : Qualitative Zusammensetzung der frei und verestert vorliegenden Triterpene der Früchte von S. albus

Triterpene (Acetate)*	RRT**	frei	verestert
24-Methylencycloartanol	1,69	+	+
Lupeol	1,57	+	+
24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol	1,42	+	+
Butyrospermol	1,38	-	+
Lanosta-7,24-dien-3ß-ol	1,56	-	+
nicht identif. tetracycl. C_{30}-Triterpen	1,26	-	-
Cycloartenol	1,52	+	+
Lanosterol	1,28	+	+
nicht identif. pentacycl. Triterpen	1,29	-	+
nicht identif. pentacycl. Triterpen	1,35	-	+
ß-Amyrin	1,37	+	?
Taraxeren-Derivat	1,47	-	+
α-Amyrin	1,52	+	-
28-Nor-Urs-12-en-3ß-ol oder 28-Nor-Olean-12-en-3ß-ol	1,52	+	-
Arboren-Derivat	1,56	-	+
Baueren-Derivat	1,81	-	+

* aufgeführt sind die identifizierten Blatt-Triterpene (s. Tab. 3,S. 46)

** RRT bezogen auf ß-Sitosterin (RT 28 Min.), OV-17-Säule

3. Die frei und verestert vorliegenden Methylsterine

Die in den Früchten identifizierten verestert und frei vorliegenden Methylsterine sind in Tabelle 18 aufgeführt. Nach den verlustreichen Reinigungsschritten wurden die Methylsterine jeweils nur durch DC- und GC-Analyse identifiziert. Eine GC/MS-Analyse nach präparativer Auftrennung der Fraktion wurde hier nicht durchgeführt. Danach führen auch die Früchte Lophenol, Obtusifoliol, Gramisterol und Citrostadienol. Die Anwesenheit von Cycloeucalenol, 31-Norlanosterol und 31-Norcycloartenol kann nicht ausgeschlossen werden, da sie bei der GC-Analyse mit einigen der genannten Verbindungen "kritische Paare" bilden.

Tabelle 18 : Die Zusammensetzung der aus den Früchten von S. albus isolierten freien und veresterten Methylsterine

Methylsterine	RRT*	frei	verestert
Lophenol/31-Norlanosterol	0,86	+	+
Obtusifoliol/31-Norcycloartenol	0,96	+	+
Gramisterol/Cycloeucalenol	1,12	+	+
Citrostadienol	1,48	+	+

* RRT bezogen auf ß-Sitosterin, OV-17-Säule

4. Die frei und verestert vorliegenden Sterine

Auch die Analyse der frei und verestert vorliegenden Sterine der Früchte erfolgte wie bei den Blättern (s. Abschnitt I.5, S. 68ff). Die Ergebnisse der DC-, GC- und GC/MS-Analysen

sind in Tabelle 19 wiedergegeben. Wie bei den Blättern stellt ß-Sitosterin den Hauptanteil des Steringemisches, gefolgt von Campesterin und 24-Methylencholesterin. Auch hier liegt Cholesterin hauptsächlich verestert und Stigmasterin zum größten Teil frei vor. Isofucosterin andererseits kommt in den Früchten hauptsächlich frei, in den Blättern dagegen verestert vor.

Tabelle 19 : Die Zusammensetzung der aus den Früchten von S. albus isolierten frei und verestert vorliegenden Sterine

Sterine	RRT*	Anteil in %	
		frei	verestert
Cholesterin	0,63	<1	2
Campesterin/24-Methylencholesterin	0,81	9	20
Stigmasterin	0,88	2	<1
ß-Sitosterin	1,00	87	77
Isofucosterin	1,11	2	<1

* RRT bezogen auf ß-Sitosterin

5. Die Fettsäuren der Triterpen-, Methylsterin- und Sterinester

Die nach Hydrolyse der Esterfraktion erhaltenen Fettsäuren der veresterten Triterpene, Methylsterine, Sterine und auch aliphatischen Alkohole wurden wie diejenigen aus den Blättern identifiziert (s. Abschnitt I.6,S. 84ff). Die qualitative und quantitative Zusammensetzung ist in Tabelle 20 wiedergegeben. Mit 59 % dominiert die Palmitinsäure in dem Fett-

säuregemisch. Wesentliche Komponenten sind daneben die Myristinsäure (6 %) und Stearinsäure (7 %) sowie die langkettigen Behensäure (7 %) und Lignocerinsäure (11 %). Der Anteil ungesättigter Säuren (Ölsäure 3 %, Linolsäure <1 %) ist geringer als bei den Blättern (s. Tab. 10, S. 89). Umgekehrt ist der Gehalt der C_{20}-C_{24}-Säuren etwas größer.

Tabelle 20 : Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fettsäuren aus der Triterpen-, Methylsterin- und Sterinesterfraktion

Fettsäuremethylester	RRT*	%
Laurinsäure	0,63	1
Tridecansäure	0,73	<1
Myristinsäure	0,82	6
Pentadecansäure	0,91	1
Palmitinsäure	1,00	59
Margarinsäure	1,09	<1
Stearinsäure	1,19	7
Ölsäure	1,26	3
Linolsäure	1,38	<1
Arachinsäure	1,49	4
Heneicosansäure	1,71	<1
Behensäure	1,99	6
Tricosansäure	2,51	1
Lignocerinsäure	2,88	11

* RRT bezogen auf Palmitinsäure-ME (RT 16 Min.)

6. Die Alkane

Bei den Alkanen der Früchte (0,04 % bezogen auf das Trockengewicht, s. Exp. Teil, S. 205) stellte n-Nonacosan mit 93 % die Hauptkomponente. Daneben wurden in geringen Mengen Alkane der C-Zahlen 16-31 nachgewiesen. Die quantitative Zusammensetzung der aus den Früchten isolierten Alkane unterscheidet sich damit von der der Blattalkane, die neben n-Nonacosan (65 %) noch einen größeren Anteil an n-Hentriacontan (29 %) enthalten (s. Tab. 11, S. 92).

Tabelle 21 : Die prozentuale Zusammensetzung der Alkane aus den Früchten von S. albus

Alkane	Summenformel	RRT*	%
n-Hexadecan	$C_{16}H_{34}$	0,17	<0,1
n-Heptadecan	$C_{17}H_{36}$	0,20	0,1
n-Octadecan	$C_{18}H_{38}$	0,26	0,1
n-Nonadecan	$C_{19}H_{40}$	0,33	<0,1
n-Eicosan	$C_{20}H_{42}$	0,42	<0,1
n-Heneicosan	$C_{21}H_{44}$	0,54	<0,1
n-Docosan	$C_{22}H_{46}$	0,64	<0,1
n-Tricosan	$C_{23}H_{48}$	0,83	0,2
n-Tetracosan	$C_{24}H_{50}$	1,00	<0,1
n-Pentacosan	$C_{25}H_{52}$	1,18	0,2
n-Hexacosan	$C_{26}H_{54}$	1,37	<0,1
n-Heptacosan	$C_{27}H_{56}$	1,57	1,1
n-Octacosan	$C_{28}H_{58}$	1,77	0,5
n-Nonacosan	$C_{29}H_{60}$	1,98	92,9
n-Triacontan	$C_{30}H_{62}$	2,16	1,2
n-Hentriacontan	$C_{31}H_{64}$	2,36	3,6

* RRT bezogen auf n-Tetracosan (RT 15,2 Min.), SE-30-Säule

7. Die frei und verestert vorliegenden primären aliphatischen Alkohole

Die gc an der OV-17-Säule ermittelte qualitative und quantitative Zusammensetzung der frei und verestert vorliegenden primären aliphatischen Alkohole ist in Tabelle 22 wiedergegeben.

Tabelle 22 : Qualitative und quantitative Zusammensetzung der frei und verestert vorliegenden primären aliphatischen Alkohole der Früchte

Alkohol	Zahl d. C-Atome	RRT*	Anteil in %	
			frei	Ester
Eicosanol-1	20	0,29	2	4
Heneicosanol-1	21	0,37	<1	<1
Docosanol-1	22	0,47	6	14
Tricosanol-1	23	0,61	<1	2
Tetracosanol-1	24	0,78	40	51
Pentacosanol-1	25	1,00	1	3
Hexacosanol-1	26	1,30	17	12
Heptacosanol-1	27	1,70	1	<1
Octacosanol-1	28	2,20	17	8
Nonacosanol-1	29	2,30	3	1
Triacontanol-1	30	3,70	12	4

* RRT bezogen auf Pentacosanol-1 (RT 7,6 Min.), OV-17-Säule

Qualitativ liegt das gleiche Alkanolmuster vor wie in den Blättern. Auch hier dominieren die n-Alkanole mit gerader C-Zahl. Hauptkomponente ist wiederum Tetracosanol-1.

Der Anteil an längerkettigen Alkanolen mit den C-Zahlen 26 bis 30 ist bei den frei vorliegenden Alkoholen auch hier etwas größer.

8. Die sekundären aliphatischen Alkohole

Nach der präparativen Ausbeute (0,08 % bezogen auf das Trockengewicht bzw. 2,12 % des Petrolätherextraktes) bilden die sekundären aliphatischen Alkohole auch in den Früchten eine Hauptkomponente der petrolätherlöslichen Lipide. Die dc, gc und ms Analyse erfolgte wie bei den sekundären Alkoholen der Blätter (s. Abschnitt I. 9, S. 97ff), mit denen sie in Schmelzpunkt (79-81°C) und IR-Spektrum übereinstimmten. Das Vorliegen von sekundären Alkoholen wurde auch hier durch ihre Oxidation zu Ketonen bestätigt. Nach Reduktion zu den Alkanen zeigte das GC an der SE-30-Säule als Hauptkomponente (97 %) ebenfalls n-Nonacosan, so daß es sich auch in den Früchten bei den sekundären Alkoholen praktisch nur um n-Nonacosanol handelt. In Mengen von unter 1 % traten im GC n-Alkane der C-Zahlen 20-28 und 30 sowie 31 auf. Neben n-Nonacosanol kommen somit in Spuren sekundäre Alkohole mit diesen C-Zahlen vor.

Die Auswertung des Massenspektrums ergab, daß Nonacosanol wie in den Blättern ein Isomeren-Gemisch aus 9-Nonacosanol, 10-Nonacosanol und 11-Nonacosanol darstellt (vgl. Abb. 51, S. 101). Aus der Intensität der Fragmente berechnet sich der Anteil von 10-Nonacosanol mit 83 %, von 9-Nonacosanol mit 10 % und von 11-Nonacosanol mit 7 %.

Die sekundären Alkohole kommen auch in den Früchten nur in der freien Form vor.

II. Isolierung und Identifizierung von Steringlykosiden, Acylsteringlykosiden, Oleanol- und Ursolsäure sowie 2α-Hydroxyursolsäure

1. Isolierung

Die DC-Analyse des Acetonextraktes ergab, daß hier wie in den Blättern Steringlykoside, Acylsteringlykoside, Oleanol- und Ursolsäure sowie 2α-Hydroxyursolsäure vorlagen (s. Abb. 69).

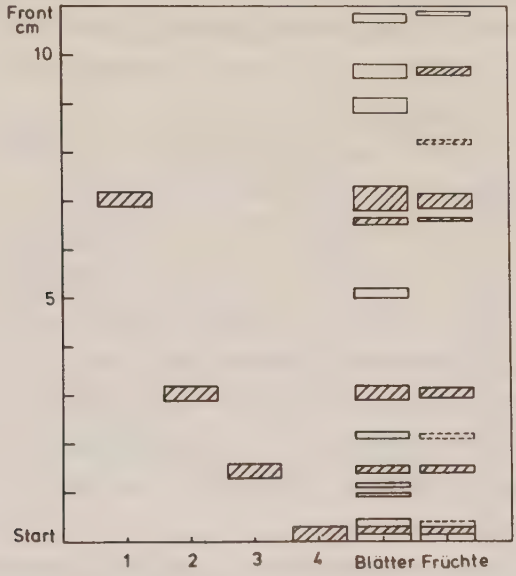


Abbildung 69 : DC des Acetonextraktes der Früchte von S. albus (DC-System XIV)

1 : Ursol-/Oleanolsäure
2 : 2α-Hydroxyursolsäure
3 : Acylsteringlykoside
4 : Steringlykoside

Zu ihrer Isolierung wurden die mit Petroläther entfetteten Früchte mit Aceton erschöpfend extrahiert (Ausbeute 8,9 % bezogen auf das Trockengewicht). 5,5 g Acetonextrakt wurden wie bei den Blättern (s. S. 113) an Kieselgel aufgetrennt. Danach, z.T. erst nach anschließender präparativer DC, lagen die Steringlykoside und Acylsteringlykoside sowie die Oleanol-/Ursolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure dc einheitlich vor (s. Exp. Teil, S. 206ff).

2. Die Steringlykoside

Die Identifizierung der Steringlykoside erfolgte analog wie bei den aus den Blättern isolierten Verbindungen (s. S. 106ff). Nach saurer Hydrolyse wurden gc Cholesterin, Campesterin/ 24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin und Isofucosterin identifiziert. An mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelfolien (DC-System V) konnten Isofucosterin und 24-Methylencholesterin als Acetate in Spuren nachgewiesen werden. Mit 99 % stellt ß-Sitosterin das Hauptsterin in dem Glykosidgemisch (s. Tab. 23).
Die Zuckerkomponente wurde dc und gc nach Alditolacetatbildung als Glucose identifiziert.

3. Die Acylsteringlykoside

Nach alkalischer Hydrolyse wurde die Säurekomponente der Acylsteringlykoside nach Methylierung gc als Palmitinsäure identifiziert (vgl. S. 108). Die saure Hydrolyse des erhaltenen Steringlykosids lieferte Glucose (DC-Analyse und GC-Analyse als Glucitolacetat, s. S. 108ff) und ein Sterin-

gemisch aus Cholesterin, Campesterin/24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin und Isofucosterin (GC-Analyse an der OV-17-Säule). 24-Methylencholesterin und Isofucosterin wurden zusätzlich als Acetate an Silbernitrat-Kieselgelfolien nachgewiesen.
ß-Sitosterin stellt mit 90 % die Hauptkomponente in dem Gemisch der mit Palmitinsäure veresterten Steringlucoside (s. Tab. 23).

Tabelle 23 : Qualitative und quantitative Zusammensetzung der frei, verestert sowie als Glykoside und Acylglykoside vorliegenden Sterine in den Früchten von S. albus

Sterine	Anteil in %			
	frei	verestert	Glykos.	Acylglyk.
Cholesterin	<1	2	<1	<1
Campesterin/ 24-Methylencholesterin	9	20	1	7
Stigmasterin	2	<1	<1	3
ß-Sitosterin	87	77	99	90
Isofucosterin	2	<1	<1	<1

4. Oleanolsäure, Ursolsäure und 2α-Hydroxyursolsäure

Das dc mit Oleanol-/Ursolsäure identische Kristallisat (Schmelzpunkt 259-260°C, IR-Spektrum identisch mit einem Ursol-/Oleanolsäure-Gemisch) zeigte nach Methylierung im GC zwei Peaks, die mit Oleanol- bzw. Ursolsäuremethylester übereinstimmten (Ursolsäuremethylester 61 %, Oleanolsäure-

methylester 39 %). Die aufgenommenen Massenspektren der beiden Verbindungen stimmten in Fragmentierung und Intensität der einzelnen Fragmente mit denen von Ursolsäure- bzw. Oleanolsäuremethylester überein (zur Fragmentierung s. Abb. 58,S. 115). Die isolierte 2α-Hydroxyursolsäure (Schmp. 243-245°C) war nach den durchgeführten Analysen (Schmp., IR, DC, MS) identisch mit der aus den Blättern isolierten Verbindung.

III. Quantitative Bestimmungen

1. Quantitative Bestimmung der Ursolsäure und der Oleanolsäure

Die quantitative Bestimmung der in den Früchten enthaltenen Ursol- und Oleanolsäure erfolgte gc nach der gleichen Methode wie bei den Blättern (s. S. 124ff). Der Gehalt an Oleanolsäure betrug 0,06 %, der an Ursolsäure 0,15 %, bezogen auf das Trockengewicht. Auch in den Früchten ist somit der Ursolsäureanteil größer.

2. Quantitative Bestimmung der Gesamtsterine

Bei den Früchten wurde auf die getrennte Bestimmung der einzelnen Sterinderivate verzichtet und nur der Steringesamtgehalt, wie auf S. 125ff beschrieben, ermittelt.
Zur Bestimmung wurden 25,0 g Früchte mit Aceton erschöpfend extrahiert. Zur Gehaltsbestimmung wurde die für die Sterinbestimmung der Blätter aufgestellte Eichkurve herangezogen. Der Gesamtgehalt an Sterinen ist mit 92,2 mg/100 g Droge in den Früchten von S. albus etwas niedriger als in den Blättern (Blätter: 129 mg/100 g Droge, s. Tab. 16,S. 128).

E. Prüfung der akuten Toxizität des Petrolätherextraktes aus den Früchten von S. albus

In der Literatur finden sich Angaben über Vergiftungsfälle mit z.T. tödlichem Ausgang nach Verzehr der Früchte von S. albus, die von Erbrechen, Durchfall und komatösen Zuständen begleitet sind (AMYOT, 1885; GRESHOFF, 1909; CHAPMAN-TURNER u. BELL, 1971; LIEBENOW u. LIEBENOW, 1973; GESSNER u. ORZECHOWSKI, 1974; MADAUS, 1976; SZAUFFER und Mitarb., 1978). Aus diesem Grund wird S. albus verschiedentlich zu den Giftpflanzen gezählt (s. Einleitung). Demgegenüber berichtet HUSEMANN bereits 1862, daß Kaninchen, die mit den Früchten gefüttert wurden bzw. die ausgepreßten Saft in den Magen gespritzt erhielten, keinerlei Vergiftungserscheinungen zeigten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen NGHIA und Mitarb. (1971) bei einer Toxizitätsprüfung an Mäusen, die bei oralen Gaben von bis zu 2 g Preßsaft-Rückstand pro kg keine Vergiftungserscheinungen zeigten. CHAVANT und Mitarb. (1975) ermittelten an Mäusen die LD_{50} für den Methanolextrakt der Früchte, die auf das Frischgewicht der Beeren umgerechnet bei 275-290 g pro kg Maus lag. Daraus folgt, daß im Methanolextrakt der Beeren keine stark toxischen Substanzen vorliegen. Es bleibt zu klären, inwieweit eventuell lipophile Bestandteile für die angebliche Toxizität der Beeren verantwortlich gemacht werden können. Aus diesem Grunde sollte die LD_{50} vom Petrolätherextrakt der Beeren bestimmt werden.

Die Untersuchungen wurden an männlichen Mäusen (Stamm NMRI, Hannover) mit einem Körpergewicht zwischen 30 und 40 g nach

einer Eingewöhnungszeit von 14 Tagen vorgenommen. Die Applikation des zähflüssigen Petrolätherextraktes erfolgte intraperitoneal. Vorversuche ergaben, daß eine toxische Wirkung erst bei Dosen von über 4 g pro Maus zu erwarten war. Zur Bestimmung der LD_{50} wurden jeweils einer Gruppe von acht Mäusen Dosen zwischen 4 und 20 g Petrolätherextrakt pro kg Maus appliziert (s. Tab. 24). Die Tiere, die acht Tage lang beobachtet wurden, wirkten nach der Applikation sediert. Bei hohen Dosen traten teilweise Krämpfe auf. Alle Tiere zeigten einen gekrümmten Rücken und teilweise eine stark beschleunigte Atmung. Etwa 6-8 Stunden nach der Applikation erholten sich die Tiere und waren kurzzeitig symptomlos. Im weiteren Verlauf trat erneut Sedierung ein, und die Tiere starben im Koma. Bei der Sektion der inneren Organe, die kurz nach Verendung der Tiere erfolgte, war die Leber auffällig gelblich marmoriert und schien hochgradig blutleer zu sein. Die übrigen Organe waren ohne auffälligen makroskopischen Befund.

Tabelle 24 : Bestimmung der LD_{50} des Petrolätherextraktes der Früchte von S. albus

Dosis i.p.		tote Tiere nach Tagen pro Applikation									tote Tiere/ eingesetzte Tiere
ml/kg	g/kg	0	1	2	3	4	5	6	7	8. Tag	
4,50	4,066	0	0	2	0	0	0	0	0	1	3/8
5,75	5,195	0	0	0	2	3	1	0	0	0	6/11
7,00	6,324	0	1	1	1	2	1	2	0	0	8/8
10,00	9,035	0	2	2	2	0	0	0	1	0	7/8
15,00	13,553	0	5	1	1	0	0	0	0	0	7/8
22,50	20,330	0	4	4	0	0	0	0	0	0	8/8

Die Berechnung der LD_{50} nach LITCHFIELD u. WILCOXON (1949) mittels Computer ergab einen Wert von 4,92 g/kg (4,22-5,74) (Slope 1,273 (1,11-1,46)). Bezogen auf die Frischdroge ergibt dies eine LD_{50} von 1226 g/kg Maus.*
Danach kommen auch im Petrolätherextrakt zumindest für Mäuse keine stark toxischen Substanzen vor. Es bleibt die Frage, inwieweit diese und die anderen an Nagetieren durchgeführten Untersuchungen auf den Menschen übertragen werden können.

F. DC-Untersuchungen einiger Caprifoliaceen-Arten

In Abschnitt B (s. S. 6ff) wurden die Schwierigkeiten der systematischen Gliederung der Familie der Caprifoliaceae aufgezeigt. Nach der Isolierung und Identifizierung einer Reihe von lipophilen Inhaltsstoffen aus S. albus sollte dc geprüft werden, ob diese auch in anderen Caprifoliaceen-Arten vorkommen und eventuell als chemische Merkmale für die Gliederung der Familie herangezogen werden können. Hierfür wurde jeweils eine Art aus dem Tribus Sambuceae, Viburneae, Linnaeeae und Lonicereae (Einteilung nach HEGNAUER, 1964) herangezogen.
Zur dc Analyse wurden 40 g zum gleichen Zeitpunkt gesammelte und getrocknete Blätter von Sambucus nigra, Viburnum opulus, Lonicera periclymenum und Symphoricarpus albus zuerst mit Petroläther und anschließend mit Aceton erschöpfend extrahiert. Die erhaltenen Petrolätherextrakte wurden im DC-System I, die Acetonextrakte im DC-System XIV unter Hinzuziehung der aus

---

* Herrn Dr. J. Abel, Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf danke ich für die Durchführung der Toxizitätsprüfung.

S. albus isolierten Substanzen untersucht (s. Abb. 70 u. 71). Im Petrolätherextrakt aller vier untersuchten Arten waren veresterte Triterpenoide, freie Sterine, Methylsterine und Triterpene nachzuweisen. Der Gehalt an freien Triterpenen war bei L. periclymenum größer, bei S. albus niedriger als bei V. opulus und S. nigra. Da es sich bei den Triterpenen,

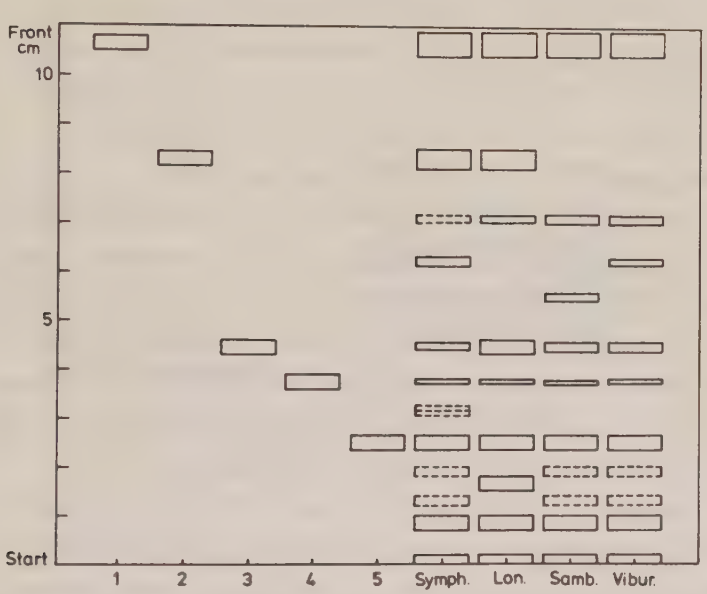


Abbildung 70 : DC der Petrolätherextrakte aus den Blättern von S. albus, L. periclymenum, S. nigra und V. opulus
Detektion: LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz

1 : Fettsäureester der Triterpene, Methylsterine und Sterine

2 : Sekundäre Alkohole

3 : Triterpene

4 : Methylsterine

5 : Sterine

Methylsterinen und Sterinen um komplexe Gemische handelt, wäre eine vergleichende Untersuchung der Zusammensetzung interessant. Sekundäre Alkohole konnten nur bei S. albus und L. periclymenum nachgewiesen werden, nicht jedoch bei V. opulus und S. nigra. Da diese bei den erstgenannten Arten eine Hauptkomponente des Extrakts bilden, ist in dem Fehlen oder Auftreten von sekundären Alkoholen der auffälligste Unterschied im DC des Petrolätherextraktes der vier Arten zu sehen. Nur bei S. albus treten darüber hinaus zwischen den Methylsterinen und Sterinen weitere Komponenten auf, deren Identifizierung jedoch noch aussteht.

Im Acetonextrakt aller untersuchten Arten kommen Steringlykoside und Acylsteringlykoside vor. Die Triterpensäuren Ursolsäure und/oder Oleanolsäure sind auch in S. nigra und V. opulus nachweisbar, nicht jedoch in L. periclymenum, die demgegenüber einen höheren Gehalt an freien Triterpenen als die anderen Arten aufweist (vgl. Abb. 70; s. auch PLOUVIER, 1974; 1975). Das Vorkommen von 2α-Hydroxyursolsäure ist neben S. albus auch für V. opulus wahrscheinlich. In den Blättern von L. periclymenum und S. nigra ist sie, wenn überhaupt, höchstens in Spuren enthalten. Zusätzlich zu diesen Verbindungen traten bei V. opulus in größerer Konzentration zwei sich mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz blau bzw. blauviolett färbende Substanzen auf, die jeweils unterhalb der genannten Triterpensäuren lagen.

Die DC-Untersuchungen geben erste Hinweise auf das unterschiedliche Vorkommen von petroläther- und acetonlöslichen Lipiden in verschiedenen Caprifoliaceen-Arten. Nach ihrer

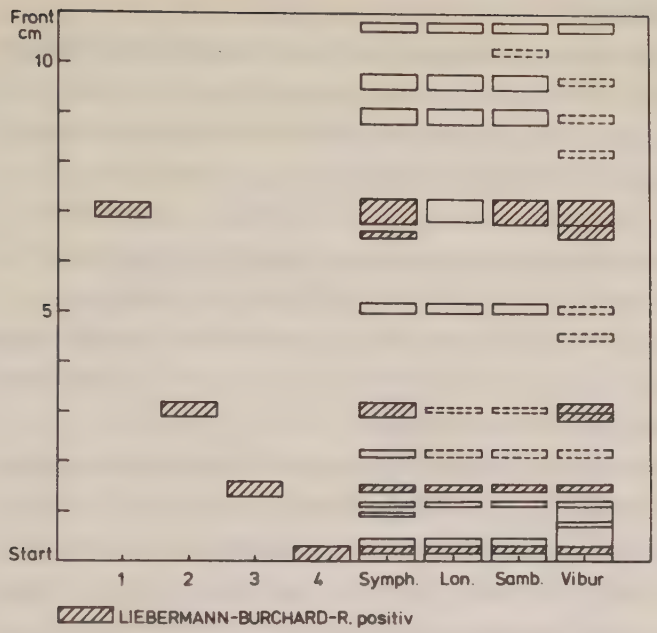


Abbildung 71 : DC-Untersuchung der Acetonextrakte entfetteter Blätter von S. albus, L. periclymenum, S. nigra und V. opulus

1 : Ursol-/Oleanolsäure 3 : Acylsteringlykoside

2 : 2α-Hydroxyursolsäure 4 : Steringlykoside

Identifizierung könnten diese Inhaltsstoffe in vergleichend durchgeführten Analysen bei taxonomischen Problemen als hilfreiche zusätzliche Merkmalsquelle herangezogen werden, was insbesondere für die komplex zusammengesetzten Triterpene und ihre Säurederivate gilt (vgl. u.a. BANDARANAYAKE und Mitarb., 1977).

C. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals die Triterpenführung der Blätter von Symphoricarpus albus (L.) Blake analysiert. Durch DC-, GC- und GC/MS-Analyse ließen sich die tetracyclischen Triterpene Cycloartenol, 24-Methylencycloartanol, Lanosterol, Lanosta-7,24-dien-3ß-ol, 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol und Butyrospermol identifizieren. Desweiteren wurde ein tetracyclischer Triterpenalkohol mit ungesättigter Seitenkette und zwei Doppelbindungen im Ringsystem nachgewiesen. Die genannten Verbindungen liegen im Blatt frei, vorwiegend jedoch mit Fettsäuren verestert vor.

Aus der Gruppe der pentacyclischen Triterpene wurden Lupeol, α- und ß-Amyrin sowie eine durch Abspaltung der Methylgruppe von C-17 aus α- bzw. ß-Amyrin hervorgehende 28-Norverbindung identifiziert. Anders als die tetracyclischen Triterpene liegen diese Verbindungen fast ausschließlich in freier Form vor (s. Tab. 3, S. 48). Daneben kommen in Spuren fünf weitere veresterte pentacyclische Triterpene vor, die wegen der zu geringen Mengen und wegen fehlender Vergleichssubstanzen nicht identifiziert werden konnten. Aufgrund der Massenspektren handelt es sich bei einem von ihnen um ein Taraxeren-Derivat, während zwei weiteren wahrscheinlich ein Arboren- bzw. ein Bauerengerüst zugrunde liegen dürfte.

Die gemeinsame biosynthetische Vorstufe aller Triterpene ist der aliphatische Terpenkohlenwasserstoff Squalen, der nach Oxidation zum 2,3-Epoxid und anschließender Aufspaltung zum 3-Hydroxysqualen-Kation spontan zu tetracyclischen und pentacyclischen Ringsystemen cyclisieren kann. Anzahl und Konfor-

mation der hierbei entstehenden Ringe sind wahrscheinlich von der Faltung der Squalenkette abhängig, die ihrerseits durch die Fixierung an der Oberfläche des die Umwandlung katalysierenden Fermentes festgelegt wird. Bei dieser Cyclisierung kommt es gleichzeitig zu Verschiebungen von H-Atomen und Methylgruppen am C-Gerüst, während die im Molekül durch die Spaltung des Epoxids entstandene positive Ladung nach der Cyclisierung durch Abspaltung eines Protons verloren geht (u.a. LUCKNER, 1969; CONNOLLY u. OVERTON, 1972; TSCHESCHE u. WULFF, 1973).

In den Blättern von S. albus sind wahrscheinlich acht der hierbei bekannten Cyclisierungswege verwirklicht. Die nachgewiesenen tetracyclischen Triterpene besitzen das Lanostan- bzw. das Euphan-Gerüst (Butyrospermol), die pentacyclischen Triterpene das Lupan-, Ursan- und Oleanan-Gerüst (Lupeol, α- bzw. ß-Amyrin) sowie das Taraxeren- und wahrscheinlich das Arboren- und Baueren-Gerüst (s. Abb. 72). Diese erstmals in einer Caprifoliaceen-Art nachgewiesene Vielfalt der möglichen Squalen-Cyclisierungen zeigt, daß diese Stoffgruppe als chemische Merkmalsquelle zur Klärung der phyletischen Einheitlichkeit der Caprifoliaceae sicher mit hilfreichen Ergebnissen herangezogen werden kann, wie dies bereits bei anderen Familien erfolgt ist (u.a. PONSINET und Mitarb., 1968; BANDARANAYAKE und Mitarb., 1977; GUNASEKERA und Mitarb., 1977; NIELSEN und Mitarb., 1979).

Von den genannten tetracyclischen Triterpenen sind Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol, die in höheren Pflanzen ubiquitär auftreten, von WILLUHN u. RICHTER (1977) in

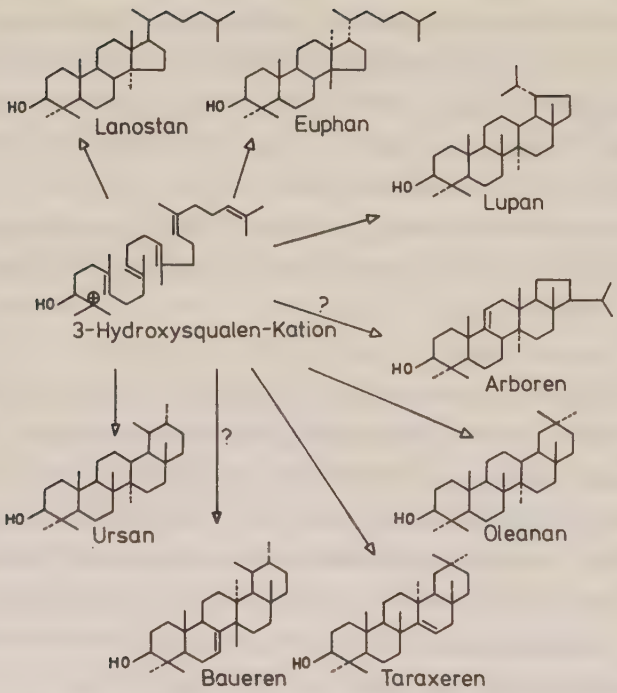


Abbildung 72 : Grundgerüste der in Symphoricarpus albus nachgewiesenen Triterpene

Sambucus nigra nachgewiesen worden. CHIARLO und Mitarb. (1979) konnten 24-Methylencycloartanol in Sambucus ebulus identifizieren. Von den pentacyclischen Triterpenen ist α-Amyrin allein (LAWRIE und Mitarb., 1964; HUNECK u. SNATZKE, 1965a; 1965b; YAGI und Mitarb., 1970; EL-MOGHAZY SHOAIB und Mitarb., 1972) oder zusammen mit ß-Amyrin (GRIMM, 1974; INOUE u. SATO, 1975;

WILLUHN u. RICHTER, 1977) in verschiedenen Sambucus-Arten und in Viburnum nervosum (SETHI und Mitarb., 1977) gefunden worden. In Viburnum erubescens wiesen AGARWAL u. RASTOGI (1974) dagegen nur ß-Amyrin nach. Das Vorkommen von Lupeol innerhalb der Caprifoliaceen ist bisher nur für die Blüten von Sambucus nigra beschrieben worden (WILLUHN u. RICHTER, 1977), in deren Rinde darüber hinaus das 28-Hydroxy-Derivat Betulin vorkommt (LAWRIE und Mitarb., 1964; HUNECK u. SNATZKE, 1965a). Die bisherigen Untersuchungen zeigen somit, daß pentacyclische Triterpene mit dem Ursan-, Oleanan- und Lupan-Gerüst auch von anderen Caprifoliaceen-Arten gebildet werden können.

Als weitere Triterpenderivate wurden in den Blättern die sich von α- und ß-Amyrin biosynthetisch durch Oxidation der Methylgruppe an C-17 ableitenden Triterpensäuren Ursol- und Oleanolsäure isoliert und identifiziert. Ihr Gehalt wurde gaschromatographisch mit 0,4 %, bezogen auf das Blatt-Trockengewicht, bestimmt, wobei die Ursolsäure mit 65,7 % in dem Säuregemisch dominiert. Demgegenüber wird von SENDRA u. JANECZKO (1973) lediglich über das Vorkommen der Oleanolsäure in S. albus-Blättern berichtet und auch nach PLOUVIER (1974; 1975) soll die isomere Ursolsäure nur in den Beeren, nicht jedoch in den Blättern enthalten sein. Beide isomeren Triterpensäuren sind einzeln oder auch gemeinsam bereits mehrfach in Sambucus- und Viburnum-Arten gefunden worden (HUNECK u. SNATZKE, 1965a; YAGI und Mitarb., 1970; AGARWAL u. RASTOGI, 1974; INOUE u. SATO, 1975; SETHI und Mitarb., 1977; WILLUHN u. RICHTER, 1977). Nach PLOUVIER (1974; 1975), der Ursolsäure auch

in anderen Caprifoliaceen-Arten nachwies, sind diese Triterpensäuren nicht nur für die Caprifoliaceae, sondern für die ganze Gattung der Dipsacales charakteristisch.

Schließlich konnten wir aus den Blättern der Schneebeere die 2α-Hydroxyursolsäure isolieren. Diese wurde bisher innerhalb der Caprifoliaceen nur in Viburnum erubescens (AGARWAL u. RASTOGI, 1974) und Viburnum nervosum (SETHI und Mitarb., 1977) gefunden. Andererseits identifizierten HÄNSEL u. KUSSMAUL (1975) in Sambucus nigra eine 2Oß-Hydroxyursolsäure, die wir in den Blättern von S. albus nicht nachweisen konnten. In den einzelnen Caprifoliaceen-Arten scheinen somit unterschiedliche Hydroxylierungen der sich von den Amyrinen herleitenden Triterpensäuren möglich zu sein, die deshalb eventuell bei der chemotaxonomischen Bearbeitung der Familie als Merkmalsquelle herangezogen werden könnten.

Als weiterer Biosyntheseschritt, von den Triterpensäuren ausgehend, scheint deren Decarboxylierung möglich zu sein, wie aus dem Auftreten des 28-Norderivats von α- oder ß-Amyrin in Schneebeerenblättern geschlossen werden könnte.

Von besonderer Bedeutung ist der Befund, daß in den Blättern von S. albus neben Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol auch Lanosterol und 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol vorkommen. Lanosterol ist das erste Squalen-Cyclisierungsprodukt in Pilzen und im tierischen Organismus und fungiert hier als zentrale Vorstufe für die Biosynthese der Steroide. Lange Zeit folgte man der Vorstellung, daß in Analogie hierzu Lanosterol auch in photosynthetisch aktiven Pflanzen die zentrale Ausgangsverbindung für die Biosynthese pflanzlicher Sterine und

anderer Steroide darstellt. Lanosterol konnte jedoch in höheren Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete lediglich die Latex von Euphorbia-Arten (GONZALEZ und Mitarb., 1954; PONSINET u. OURISSON, 1967; 1968). Andererseits fand man in den untersuchten höheren Pflanzen das isomere Cycloartenol. Das führte zu der allgemeinen Annahme, daß in photosynthetisch aktiven Pflanzen Lanosterol durch Cycloartenol als primäres Squalen-Cyclisierungsprodukt innerhalb der Steroidbiosynthese ersetzt wird, und in der Phylogenie der Lebewesen somit die Gabelung in photosynthetisch aktive Organismen (Pflanzen) und photosynthetisch inaktive Organismen (Pilze und Tiere) gleichzeitig verbunden ist mit einer Variation in der Cyclisierung des Squalenepoxids (s. auch WILLUHN, 1976). Das Vorkommen dieser andersartigen, die Bildung von Cycloartenol hervorrufenden Cyclase konnte inzwischen nachgewiesen werden (REES und Mitarb., 1969; CATTEL und Mitarb., 1976).

Als Beweis dieser Hypothese dienten u.a. die Befunde, daß bei Versuchen mit radioaktiv markiertem Acetat, Mevalonat und 2,3-Oxidosqualen bei einer Reihe von Pflanzen und pflanzlichen Gewebekulturen stets nur Cycloartenol, in keinem Fall jedoch Lanosterol nachgewiesen werden konnte (BENVENISTE und Mitarb., 1966; EHRHARDT und Mitarb., 1967; REES und Mitarb., 1968b; EPPENBERGER und Mitarb., 1969; HEINTZ u. BENVENISTE, 1970; GIBBONS und Mitarb., 1971; NICOLAS und Mitarb., 1975) und daß markiertes Cycloartenol als Vorstufe für die Sterinbiosynthese herangezogen wird (u.a. HEWLINS und Mitarb., 1969). Desweiteren wurde in zellfreien Ex-

trakten aus höheren Pflanzen verschiedener Familien ein Enzym nachgewiesen, das den Cyclopropanring öffnen kann. Diese enzymatische Reaktion wird jedoch durch die Anwesenheit einer 4ß-Methylgruppe behindert, so daß Cycloartenol selbst oder 24-Methylencycloartanol nicht als Substrate herangezogen werden können, was wiederum die Abwesenheit von Lanosterol und 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol in höheren Pflanzen erklärte (HEINTZ u. BENVENISTE, 1974). Die Öffnung des Cyclopropanringes erfolgt vielmehr auf der Stufe der Methylsterine, auf der Cycloeucalenol in Obtusifoliol überführt wird (s. Abb. 73, S. 159).

In den letzten drei Jahren ist Lanosterol jedoch nicht nur in allen untersuchten Euphorbia-Arten (NIELSEN und Mitarb., 1979; SEKULA u. NES, 1980), sondern auch in den Samen verschiedener Solanaceen-Arten (AHMED und Mitarb., 1977; ITOH und Mitarb., 1977a; 1977b), im Samen von Brassica napus (ITOH und Mitarb., 1978a) sowie im Samenfett der Sapotaceae Butyrospermum parkii (ITOH und Mitarb., 1980) gefunden worden. Mit der erfolgten Identifizierung von Lanosterol auch in den Blättern von S. albus ist die Familie der Caprifoliaceae neben den Euphorbiaceen, Solanaceen, Brassicaceen und Sapotaceen die fünfte Familie, in der das Vorkommen von Lanosterol nachgewiesen werden konnte. Da diese Familien im Pflanzensystem weit auseinanderstehen, ist anzunehmen, daß Lanosterol in höheren Pflanzen doch häufiger gebildet wird, als bis vor kurzem angenommen wurde. Es ist daher nicht auszuschließen, daß in höheren Pflanzen neben dem Hauptweg über Cycloartenol ein zweiter Weg der Sterinbiosynthese auch über

Lanosterol laufen kann, zumal hier bekannt ist, daß an Pflanzen oder pflanzlichen Zellkulturen verfüttertes markiertes Lanosterol zur Sterinbildung herangezogen werden kann (BAISTED und Mitarb., 1968; HEWLINS und Mitarb., 1969; NICOTRA und Mitarb., 1977).

Für die Bildung von Lanosterol in den bisher bekannten Arten der genannten Familien müssen zwei Möglichkeiten diskutiert werden:

1. Diese Pflanzen besitzen neben der Squalenepoxid-Cyclase, die zu Cycloartenol führt, eine weitere Cyclase, die Squalenepoxid wie bei den Pilzen und Tieren zu Lanosterol cyclisiert.
2. Auch in diesen Pflanzen ist das erste Cyclisierungsprodukt Cycloartenol, dessen Cyclopropanring jedoch durch eine hier vorhandene Δ^8-Isomerase bereits vor Abspaltung der Methylgruppe an C-4 unter Bildung von Lanosterol geöffnet wird.

Eine derartige Isomerase ist in der Latex von Euphorbia-Arten nachgewiesen worden (PONSINET u. OURISSON, 1968), während HEINTZ u. BENVENISTE (1974) sie in den von ihnen herangezogenen Pflanzen nicht finden konnten. CATTEL und Mitarb. (1976) dagegen konnten nach Fütterungsversuchen mit 1-trans-1'-Norsqualen-2,3-epoxid die getrennte Cyclisierung zu 31-Norcycloartenol und 31-Norlanosterol nachweisen.

Zur Klärung dieser Frage müßten die von diesen Autoren durchgeführten Untersuchungen an Lanosterol-führenden höheren Pflanzen wiederholt werden. Das zusätzliche Auftreten eines der in Frage kommenden beiden Enzyme , die jeweils die Bildung von Lanosterol katalysieren, würde auch für die Überprüfung der

phyletischen Einheitlichkeit der Caprifoliaceen von großem Nutzen sein.

Im Biosyntheseweg der Sterine treten als Zwischenstufe Methylsterine auf. Diese wurden erstmals auch aus den Blättern von S. albus isoliert und als ein Gemisch aus Cycloeucalenol, Obtusifoliol, Gramisterol (24-Methylenlophenol), Citrostadienol (24-Äthylidenlophenol), Lophenol, 31-Norcycloartenol, 31-Norlanosterol und 31-Norlanost-8-en-3ß-ol identifiziert (s. Abb. 73). Mit Ausnahme der drei letztgenannten Verbindungen sind diese Terpenoide bereits mehrfach in den verschiedensten Pflanzen nachgewiesen worden (u.a. NAGASAMPAGI und Mitarb., 1971; EVANS, 1973; WILLUHN u. KÖSTENS, 1974; ITOH und Mitarb., 1978b). Seltener dagegen finden sich Angaben über das Vorkommen von 31-Norcycloartenol, 31-Norlanosterol und 31-Norlanost-8-en-3ß-ol. Diese Methylsterine konnten bisher nur von REES und Mitarb. (1968a), CHARLES und Mitarb. (1969), DEVYS und Mitarb. (1970), JEONG und Mitarb. (1975b) sowie ITOH und Mitarb. (1977c; 1978a; 1978b) in Pflanzen nachgewiesen werden.

Diese drei Verbindungen sind deshalb interessant, weil sie als Zwischenstufen in der Biosynthese des auch im Pflanzenreich ubiquitär auftretenden Cholesterins postuliert werden (REES und Mitarb., 1968a; s. Abb. 73). Dieses in der Seitenkette nicht alkylierte Sterin muß auf einem Nebenweg der Sterinbiosynthese gebildet werden, da Demethylierungen der Seitenkette bei den typischen pflanzlichen Sterinen nicht nachgewiesen werden konnten. Die drei genannten Nor-Verbindungen werden deshalb ebenfalls als ubiquitär im Pflanzen-

reich auftretende Verbindungen angesehen (HEINTZ u. BENVENISTE, 1974). In den Schneebeerenblättern liegen sie frei und mit Fettsäuren verestert vor.

Die Sterine von S. albus sind bereits von SENDRA u. JANECZKO (1973) untersucht worden, die als einziges Sterin ß-Sitosterin angeben. Wir haben das aus den Blättern isolierte Steringemisch analysiert und hier Cholesterin, 24-Methylencholesterin, Campesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin und Isofucosterin nachweisen können. Diese Sterine wurden schon mehrfach in höheren Pflanzen gefunden, einzelne von ihnen auch in anderen Caprifoliaceen-Arten (Sambucus sieboldiana: YAGI und Mitarb., 1970; Sambucus ebulus: GRIMM, 1974, CHIARLO und Mitarb., 1979; Sambucus nigra: WILLUHN u. RICHTER, 1977). Neben diesen, für höhere Pflanzen typischen Sterinen, konnten wir ein weiteres Sterin nachweisen, bei dem es sich aufgrund der GC- und GC/MS-Analyse um Clerosterin handelt. Es wurde von ADLER u. KASPRZYK (1975) in Blättern und Samen von Calendula officinalis gefunden. Über sein Vorkommen in Caprifoliaceen-Arten ist bisher nichts berichtet worden.

Die genannten Sterine kommen in den Blättern von S. albus frei, mit Fettsäuren verestert und in Form von Glykosiden und Acylglykosiden vor, wobei in der quantitativen Zusammensetzung des Steringemisches nur geringe Unterschiede auftreten (s. Tab. 14, S. 105; vgl. dagegen ADLER u. KASPRZYK, 1975; JOHANSSON, 1979). Die Steringlykoside wurden als Glucoside identifiziert, die Acylsteringlykoside als Palmitinsäureester dieser Glucoside (vgl. auch ELBEIN u. FORSEE, 1975; EICHENBERGER, 1977; GRUNWALD, 1978). Der Gesamtgehalt der Sterine wurde photo-

metrisch mit 0,13 % ermittelt und entspricht damit der Größenordnung, wie er bisher allgemein auch in anderen Pflanzen gefunden worden ist (u.a. Blätter von Solanum dulcamara: 0,11 %, WILLUHN u. KÖSTENS, 1975; Blüten von Sambucus nigra: 0,11 %, RICHTER u. WILLUHN, 1977).

Darüber hinaus wurde der Anteil der freien, der veresterten und der glykosidisch gebundenen Sterine an den Gesamtsterinen photometrisch ermittelt. Danach entfallen auf die frei vorliegenden Sterine 39 %, auf die veresterten 30 % und auf die glykosidisch gebundenen 31 %. In den Blüten von Sambucus nigra liegen nach RICHTER u. WILLUHN (1977) dagegen 71 % der Sterine frei, 25 % verestert und nur 4 % glykosidisch gebunden vor, während in den Blättern von Solanum dulcamara der Anteil an veresterten Sterinen nur 2 % beträgt (WILLUHN u. KÖSTENS, 1975). In der prozentualen Beteiligung der genannten Sterinderivate an der Sterinführung scheinen somit bei einzelnen Pflanzenarten auffällige Unterschiede aufzutreten, wie sie WILLUHN u. KÖSTENS (1975) auch bei verschiedenen Organen derselben Species nachweisen konnten.

In Abbildung 73 sind die von uns in S. albus-Blättern nachgewiesenen Triterpene, Methylsterine und Sterine in der Reihenfolge wiedergegeben, wie sie nach den derzeitigen Kenntnissen in der Pflanze gebildet werden (BENVENISTE und Mitarb., 1969; KNAPP u. NICHOLAS, 1971; GRUNWALD, 1975; WILLUHN, 1976; GOAD, 1977).

Zur Biosynthese der Sterine aus Cycloartenol sind neben der Öffnung des Cyclopropanringes im wesentlichen noch zwei Schritte nötig: Die Abspaltung der drei Methylgruppen an C-4

Abbildung 73 : Schema eines möglichen Biosyntheseweges der Triterpene, Methylsterine und Sterine in S. albus

und C-14 sowie die Methylierung der Seitenkette. Wie aus dem Schema der isolierten Verbindungen hervorgeht, erfolgt bei der Bildung der in der Seitenkette alkylierten typischen pflanzlichen Sterine die erste Methylierung bereits auf der Stufe der Triterpene (4,4-Dimethylsterine), d.h. bei Cycloartenol. Danach wird die 4α-Methylgruppe unter Bildung von Cycloeucalenol abgespalten. Die zurückbleibende 4ß-Methylgruppe epimerisiert zur 4α-Stellung (GHISALBERTI und Mitarb., 1969; KNAPP u. NICHOLAS, 1970). Auf dieser Stufe erfolgt die enzymatische Öffnung des Cyclopropanringes, wobei Obtusifoliol entsteht. Wie das Auftreten von Citrostadienol zeigt, kann die zweite Methylierung der Seitenkette bereits auf der Stufe der Methylsterine durchgeführt werden.

Während die Bildung von Campesterin über 24-Methylencholesterin läuft, können die anderen Sterine auf verschiedenen Wegen gebildet werden, da die für die Seitenkettenalkylierung verantwortlichen Enzyme relativ unspezifisch sind und die Alkylierung unabhängig vom Grad der Ring-Methyl-Substitution durchführen können. Das beim zweiten Methylierungsschritt durch Reaktion der Methylengruppe mit S-Adenosylmethionin intermediär entstehende Kation kann auf verschiedenen, wohl taxonspezifischen Wegen stabilisiert werden (LEDERER, 1969; GOAD und Mitarb., 1974; WILLUHN, 1976; GOAD, 1977; CATTEL und Mitarb., 1980).

Ein zweiter Weg führt von Cycloartenol ausgehend zum in der Seitenkette nicht alkylierten Cholesterin. In diesem Nebenweg wird von Cycloartenol vor Methylierung der Seitenkette eine Methylgruppe von C-4 abgespalten. Anschließend erfolgt die

Öffnung des Cyclopropanringes zum 31-Norlanosterol, das dann über Lophenol in Cholesterin überführt wird.
Nicht auszuschließen ist, daß auch von Lanosterol ausgehend Cholesterin und auch die in der Seitenkette alkylierten Sterine gebildet werden können, was durch Markierungsversuche überprüft werden müßte. In Abbildung 73 sind als Möglichkeiten einmal die Bildung von 31-Norlanosterol oder der Weg über 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol (vgl. auch ALCAIDE und Mitarb., 1968; HEWLINS und Mitarb., 1969) zum Obtusifoliol aufgeführt. Die Schlüsselstellung von Obtusifoliol im Sterinstoffwechsel der Pflanze würde damit erneut bestätigt werden (vgl. BENVENISTE und Mitarb., 1969).
Von den identifizierten Verbindungen sollen Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol nach PINHAS (1971) eine entzündungshemmende und bindegewebsharmonisierende Wirkung entfalten. Sitosterin wird zur Therapie der Hyperlipidämie medizinisch eingesetzt (WEITZEL, 1975). Vor kurzem wiesen GUPTA und Mitarb. (1980) nach, daß Sitosterin entzündungshemmend und fiebersenkend wirkt. Darüber hinaus soll es in der Lage sein, den durch N-Methyl-N-nitrosoharnstoff hervorgerufenen Darmkrebs günstig zu beeinflussen (RAICHT und Mitarb., 1980).

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt wurde, werden heute in zunehmenden Maße auch Alkane, primäre und sekundäre aliphatische Alkohole und Fettsäuren für chemotaxonomische Fragestellungen herangezogen, weshalb diese Stoffgruppen mit in die Untersuchung einbezogen wurden. In dem aus der Fraktion der veresterten Triterpene, Methylsterine, Sterine

und primären aliphatischen Alkohole nach Hydrolyse erhaltenen Fettsäuregemisch bildeten Palmitinsäure (52 %), Ölsäure (20 %) und Stearinsäure (7 %) die Hauptkomponenten. Auffällig ist, daß neben dem relativ geringen Anteil an ungesättigten Säuren (ca. 23 %) längerkettige gesättigte Fettsäuren der C-Zahlen 19 bis 24 auftreten (zusammen ca. 11 %; s. Tab. 10,S. 89). Das entspricht der Beobachtung von RADWAN und Mitarb. (1974), daß in dem Maße, wie die Bildung ungesättigter Fettsäuren behindert, die Synthese längerkettiger Fettsäuren gefördert wird.

Im isolierten Paraffinkohlenwasserstoffgemisch der Blätter wurden als Hauptkomponenten n-Nonacosan (65,2 %) und n-Hentriacontan (28,8%) gefunden, was den bereits vorliegenden Angaben von WILLUHN (1974) entspricht. Das Ergebnis bestätigt somit die Auffassung, daß die Alkanzusammensetzung konstant und typisch für die jeweilige Pflanzenart ist, was sie für taxonomische Fragestellungen geeignet macht (PURDY u. TRUTER, 1961; EGLINTON u. HAMILTON, 1967).

Die frei und verestert vorliegenden primären aliphatischen Alkohole bilden ein Gemisch der homologen C_{20}-C_{30}-Verbindungen, in dem hauptsächlich Eicosanol-1, Docosanol-1 und Tetracosanol-1 (C_{20}-, C_{22}- und C_{24}-Alkohole) auftreten (s. Tab. 12,S. 96). Während bei den frei vorliegenden Alkoholen noch nennenswerte Mengen der längerkettigen Vertreter vorkommen - die geradzahligen jeweils dominierend - treten diese bei den veresterten Alkoholen nur in Spuren auf. Die quantitative Zusammensetzung der primären aliphatischen Alkohole der Schneebeerenblätter unterscheidet sich von der

der Holunderblüten (WILLUHN u. RICHTER, 1977). Es bleibt jedoch zu prüfen, ob es sich hierbei, wie bei den Alkanen (WILLUHN, 1974), um einen artspezifischen Unterschied handelt oder ob hier lediglich eine organspezifische Variabilität vorliegt.

Eine wesentliche Komponente der petrolätherlöslichen Lipide der Blätter von S. albus ist das Isomerengemisch der frei vorliegenden sekundären aliphatischen Alkohole (ca. 11 %, entsprechend 0,37 % bezogen auf das Blatt-Trockengewicht). Es besteht aus 10-Nonacosanol (90,1 %), 9-Nonacosanol (5,8 %) und 11-Nonacosanol (3,6 %). Das gleichzeitige dominierende Auftreten von n-Nonacosan bei den Alkanen sowie der n-Nonacosanole bei den sekundären aliphatischen Alkoholen unterstützt die Meinung verschiedener Autoren (WOLLRAB, 1969; KOLATTUKUDY und Mitarb., 1973), daß die sekundären Alkohole durch Hydroxylierung der Alkane gebildet werden. Gesättigte sekundäre aliphatische Alkohole sind in Caprifoliaceen-Arten bisher nicht nachgewiesen worden.

In den reifen Beeren von S. albus wurden nach analoger Aufarbeitung dieselben Triterpene, Methylsterine, Sterine, Triterpensäuren und aliphatischen Verbindungen wie in den Blättern identifiziert. Eine nennenswerte organspezifische Differenzierung hinsichtlich dieser lipophilen Inhaltsstoffe konnte nicht festgestellt werden. Die Früchte ziehen zur Veresterung der Triterpene, Methylsterine, Sterine und primären aliphatischen Alkohole fast ausschließlich gesättigte Fettsäuren heran. Der Anteil an ungesättigten Säuren (Ölsäure, Linolsäure) war mit nur ca. 3 % bedeutend geringer als bei

den Blättern, während andererseits der Anteil an längerkettigen Fettsäuren mit ca. 22 % hier entsprechend höher war (vgl. Tab. 20, S. 134 und Tab. 10, S. 89). Dieser Befund ist auch insofern interessant, als CHIARLO und Mitarb. (1979) in den Früchten von Sambucus ebulus hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren (93,4 %) fanden. Darüber hinaus identifizierten die Autoren hier α- und ß-Amyrin als dominierende Triterpene, während diese in S. albus-Früchten nur in Spuren auftreten. Diese Ergebnisse zeigen, daß auffallende Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Früchte dieser beiden Caprifoliaceen-Arten existieren.

Die Beeren von S. albus werden aufgrund älterer Angaben als giftig angesehen (s. Einleitung bzw. S. 142). Eine in neuerer Zeit an Nagetieren durchgeführte Toxizitätsprüfung ergab, daß hydrophile Bestandteile hierfür nicht verantwortlich gemacht werden können (NGHIA und Mitarb., 1971; CHAVANT und Mitarb., 1975). Die LD_{50} des Methanolextraktes liegt, auf das Frischgewicht der Früchte umgerechnet, bei 275-290 g pro kg Maus. Die von uns mit dem Petrolätherextrakt der Beeren an Mäusen durchgeführte Toxizitätsprüfung ergab, daß lipophile Bestandteile ebenfalls nicht an der Giftwirkung der Beere beteiligt sind. Die LD_{50} des Petrolätherextraktes betrug 4,92 g pro kg Maus, entsprechend 1226 g frische Beeren. Inwieweit diese Untersuchung auf den Menschen übertragen werden kann, bleibt weiterhin offen. Zumindest an Nagetieren läßt sich die angebliche Giftigkeit der Schneebeere nicht nachweisen.

Die durchgeführten Analysen der lipophilen Inhaltsstoffe von S. albus haben gezeigt, daß diese sicher hilfreich bei der

gegenwärtigen taxonomischen Neugliederung der Familie der Caprifoliaceae eingesetzt werden können. Hier wäre in erster Linie die Fähigkeit zur Synthese von Lanosterol und die Verbreitung der pentacyclischen Triterpene mit unterschiedlichen Grundgerüsten vergleichend zu untersuchen. Orientierende DC-Analysen mit den Petroläther- und Acetonextrakten aus Blättern je eines Vertreters der Caprifoliaceen-Triben Sambuceae, Viburneae, Linnaeeae und Lonicereae haben darüber hinaus gezeigt, daß daneben auch im Vorkommen von Triterpensäuren und ihren Hydroxyderivaten sowie von sekundären aliphatischen Alkoholen auffallende Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern dieser Familie gegeben sind. Auf der Grundlage der an Symphoricarpus albus durchgeführten Analysen lassen sich somit zukünftig die lipophilen Inhaltsstoffe mit gezielten Fragestellungen bei der chemotaxonomischen Bearbeitung der Familie der Caprifoliaceae einsetzen.

H. Zusammenfassung

1. Aus dem Petrolätherextrakt wurden die tetracyclischen Triterpene Cycloartenol, Lanosterol, 24-Methylencycloartanol, 24-Methylenlanost-8-en-3ß-ol, Lanosta-7,24-dien-3ß-ol und Butyrospermol isoliert und durch $AgNO_3$-DC-, GC- und GC/MS-Analyse identifiziert. Ein weiteres tetracyclisches Triterpen mit ungesättigter Seitenkette und zwei Doppelbindungen im Ringsystem wurde durch GC und MS charakterisiert. Die Verbindungen liegen im Blatt frei, vorwiegend jedoch mit Fettsäuren verestert vor.
2. Aus der Gruppe der pentacyclischen Triterpene wurden Lupeol, α- und ß-Amyrin sowie eine aus α- oder ß-Amyrin hervorgehende 28-Norverbindung identifiziert. Sie kommen im Blatt fast ausschließlich in freier Form vor. Daneben wurden fünf weitere, in geringer Konzentration vorliegende, veresterte pentacyclische Triterpene nachgewiesen. Aufgrund der Massenspektren ist eines von ihnen ein Taraxeren-Derivat, während zwei weiteren wahrscheinlich ein Arboren- bzw. ein Bauerengerüst zugrunde liegt.
3. Die Methylsterine der Blätter wurden als ein Gemisch aus Cycloeucalenol, Obtusifoliol, Gramisterol, Citrostadienol, 31-Norcycloartenol, 31-Norlanosterol, 31-Norlanost-8-en-3ß-ol und Lophenol identifiziert. Sie liegen ebenfalls frei und mit Fettsäuren verestert vor.
4. Bei den Sterinen der Schneebeerenblätter handelt es sich um ein Gemisch aus Cholesterin, Campesterin, 24-Methylencholesterin, Stigmasterin, ß-Sitosterin, Clerosterin und Isofucosterin. ß-Sitosterin stellt mit ca. 80 % die Hauptkomponente.

5. Die unter 4. genannten Sterine liegen in den Blättern frei, mit Fettsäuren verestert und als Glucoside und Acylglucoside vor. Letztere wurden als Palmitinsäureester der Steringlucoside identifiziert.
6. Der Steringehalt in den Blättern wurde photometrisch bestimmt. Er beträgt 0,13 % vom Trockengewicht. Davon entfallen 39 % auf die frei vorliegenden, 30 % auf die verestert und 31 % auf die glykosidisch gebunden vorliegenden Sterine.
7. Der mögliche Biosynthese-Weg der 20 identifizierten tetracyclischen Triterpene, Methylsterine und Sterine wurde diskutiert.
8. Die aus der Fraktion der veresterten Triterpene, Methylsterine, Sterine und aliphatischen Alkohole nach Hydrolyse gewonnenen Fettsäuren wurden als ein Gemisch aus den gesättigten Fettsäuren der C-Zahlen 12 und 14 bis 24 sowie der ungesättigten Palmitolein-, Öl- und Linolsäure identifiziert. Hauptkomponenten sind Palmitinsäure (52 %), Stearinsäure (7 %) und Ölsäure (20 %).
9. Als weitere Triterpenverbindungen wurden aus den Blättern von S. albus Ursol- und Oleanolsäure sowie 2α-Hydroxyursolsäure isoliert und identifiziert. Der Gehalt an Ursol- und Oleanolsäure wurde gaschromatographisch mit 0,4 % bestimmt. Die Ursolsäure stellt mit 65,7 % die Hauptkomponente.
10. Die Alkane der Blätter wurden als homologe Reihe der C-Zahlen 16-33 identifiziert, in der die Homologen mit ungeraden C-Zahlen (C-29: 65 %, C-31: 29 %) vorherrschen.

11. Die frei und mit Fettsäuren verestert vorliegenden aliphatischen primären Alkohole der Blätter wurden als homologe Reihe der C-Zahlen 20 bis 30 identifiziert. Die geradzahligen Vertreter, hauptsächlich jedoch die C_{20}-, C_{22}- und C_{24}-Verbindungen dominieren hierbei.
12. Als eine Hauptkomponente des Petrolätherextraktes (ca. 11 %) wurde der aliphatische sekundäre Alkohol n-Nonacosanol identifiziert. Er bildet ein Gemisch aus den Isomeren 9-Nonacosanol (5,8 %), 10-Nonacosanol (90,1 %) und 11-Nonacosanol (3,6 %).
13. Die Früchte von S. albus wurden in der gleichen Weise wie die Blätter analysiert, und die unter 1.-12. genannten Verbindungen auch hier identifiziert. Der Gehalt an Ursol- und Oleanolsäure wurde mit 0,2 %, der an Gesamtsterinen mit 0,92 % quantitativ bestimmt.
14. Eine an Mäusen mit dem Petrolätherextrakt der Früchte durchgeführte Toxizitätsprüfung ergab, daß die LD_{50} bei 4,92 g pro kg Maus, entsprechend 1226 g frische Beeren, liegt. Da von anderen Autoren die LD_{50} des Methanolextraktes auf das Frischgewicht der Früchte umgerechnet mit 275-290 g pro kg Maus ermittelt wurde, ist zumindest an Nagetieren die beschriebene Giftigkeit der Beeren nicht nachzuweisen.
15. Orientierende DC-Analysen mit den Petroläther- und Acetonextrakten aus den Blättern von je einem Vertreter aus den Triben Sambuceae, Viburneae, Linnaeeae und Lonicereae lieferten erste Hinweise auf ein unterschiedliches Komponentenspektrum bei den petroläther- und acetonlöslichen

Lipiden dieser Vertreter. Die Eignung der identifizierten lipophilen Inhaltsstoffe für eine zukünftige chemotaxonomische Bearbeitung der Familie der Caprifoliaceae wird diskutiert.

J. Experimenteller Teil

I. Spektroskopische Methoden

Die Messung der UV-Absorption erfolgte mit dem Spektralphotometer Typ DB-G der Fa. BECKMAN bei 20°C. Die Infrarot-Spektren wurden mit dem Spektrophotometer 297 der Fa. PERKIN-ELMER aufgenommen. Die Untersuchung der Substanzen erfolgte in KBr-Preßlingen, in Ausnahmefällen in Chloroform (Uvasol). Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer Typ VARIAN MAT 311 A im Institut für Organische Chemie aufgenommen, die GC/MS-Analysen mit dem Massenspektrometer Typ VARIAN MAT CH 7 A und dem Gaschromatographen VARIAN 2700 im Institut für Physiologische Chemie sowie mit dem Massenspektrometer FINNIGAN 3500 und dem Gaschromatographen FINNIGAN 9500 im Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf durchgeführt.* Die Ionisationsspannung betrug jeweils 70 eV.

II. Bestimmung physikalischer Konstanten

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch Typ 350 der Fa. LEITZ bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.
Die Bestimmung der spezifischen Drehung erfolgte mit dem Polarimeter Typ 243 der Fa. PERKIN-ELMER bei 20°C.

---

* Herrn Dr. G. Schmidtberg, Institut für Organische Chemie der Universität Düsseldorf, Herrn Dr. U. Matthiesen, Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf und Herrn Dr. H.-J. Hemmerling, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf danke ich für die Aufnahme der Spektren.

III. Chromatographische Methoden

1. Analytische Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren

Als Adsorbens dienten, soweit nichts anderes angegebenen, DC-Alufolien mit Kieselgel 60 F_{254} (MERCK). Die Chromatographie wurde in der Regel über eine Laufstrecke von 10 cm bei Kammersättigung durchgeführt.
Die Verhältnisangaben bei den Fließmitteln beziehen sich jeweils auf Volumenanteile.

1.1. Sterine, Methylsterine und Triterpene

System I : Petroläther (40-60°C)/Essigsäureäthylester/Toluol (80 : 15 : 5) (modifiziert nach SCHREIBER u. OSSKE, 1962)

Dieses System war wegen der guten Gruppentrennung von Sterinen, Methylsterinen, Triterpenen, primären und sekundären Alkoholen und der Abtrennung der Ester das Standardsystem für die DC-Analysen des Petrolätherextraktes.

System II : Toluol/Petroläther (40-60°C) (65 : 35)

System III : Chloroform/Äthanol abs. (99 : 1) (EICHENBERGER u. GROB, 1970)

System IV : Benzol/Äther (9 : 1)

System V : Adsorbens : Kieselgel 60/$AgNO_3$ auf Alufolie (MERCK)
Laufmittel: n-Hexan/Benzol (1 : 1) (EVANS, 1973)

Dieses System wurde zur Auftrennung der acetylierten Triterpene, Methylsterine und Sterine benutzt.
Zur Imprägnierung der DC-Folien mit $AgNO_3$ wurden diese 90 Sekunden lang in eine 20 % ige wäßrige Silbernitratlösung eingetaucht. Nach Trocknen bei Zimmertemperatur (ca. 45 Min.) blieben die Folien 30 Min. lang bei 110°C im Trockenschrank. Die Herstellung sowie Aufbewahrung der mit $AgNO_3$ imprägnierten Folien erfolgte unter Lichtausschluß.

Die Detektion erfolgte jeweils mit Molybdatophosphorsäure-Reagenz oder LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz.
LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz: Acetanhydrid/Schwefelsäure konz., 10 : 1. Nach Besprühen und Erwärmen bei 110°C für 3-4 Min. geben die Δ^5-Sterine das charakteristische Farbspiel von rot, rotviolett über blau nach grün, während sich die Triterpene braun bis braunviolett färben.
Molybdatophosphorsäure-Reagenz: gleiche Anteile Schwefelsäure konz. und Phosphorsäure konz. + 10 % H_2O + 2 % Phosphormolybdänsäure. Nach Erhitzen der besprühten Platten bei 110°C für 5 Min. färben sich Δ^5-Sterine rötlich, mit Übergang zu blauviolett, die Δ^7-Sterine und Triterpene braun bis braunviolett (FISCHER u. HERTEL, 1968).

1.2. Fettsäuren und Fettsäuremethylester

System VI : Chloroform/Essigsäureäthylester/Ameisensäure (90 : 10 : 2) (REHM, 1967)

In diesem System lassen sich gesättigte und ungesättigte n-Fettsäuren von Epoxy- und Hydroxyfettsäuren abtrennen.

Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenz-Indikator Pyranin (3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium, Fa. BAYER/ Leverkusen). Dieser ergibt, als 0,015 % ige wäßrige Lösung auf die Platten aufgesprüht oder in gleicher Konzentration dem Adsorbens beigegeben, im UV-Licht bei 360 nm eine hellblaue Fluoreszenz der Fettsäuren auf gelblich-grünem Grund.

System VII : Pentan/Äther (9 : 1)
Dieses System diente zur DC der Fettsäuremethylester. Die Detektion erfolgte mit Pyranin.

System VIII : Adsorbens : Kieselgel H/Kieselgur (3 g : 7 g)
(WAGNER u. POHL, 1964)
Laufmittel : Petroläther (60-80°C)/Äther (4 : 1)
(MANGOLD u. KAMMERECK, 1961)
Dieses System trennt gesättigte Fettsäuremethylester, die mit der Fließmittelfront wandern, von den Hg(II)-acetat-Addukten der ungesättigten Fettsäuremethylester, die am Start liegen bleiben.
Die Hg(II)-acetat-Addukte wurden mit einer 0,1 % igen äthanolischen Dithizonlösung als rosa Flecken detektiert, die gesättigten FSME nach Einstellen in eine Jodkammer als braune Flecken (vgl. KATING und Mitarb., 1970).

System IX : Adsorbens : Kieselgel H/Kieselgur (3 g : 7 g)
(WAGNER u. POHL, 1964)
Laufmittel: n-Propanol/Eisessig (100 : 1)
(MANGOLD u. KAMMERECK, 1961)

In diesem System lassen sich Gemische ungesättigter FSME in Form ihrer Hg(II)-acetat-Addukte nach der Anzahl der Doppelbindungen auftrennen.

1.3. Sekundäre aliphatische Alkohole

System X : Petroläther (40-60°C)/Benzol (65 : 35)

System XI : Benzol (KOLATTUKUDY, 1970b)

Die Detektion erfolgte mit konz. Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen.

1.4. Zucker

System XII : Adsorbens : Kieselgur G mit Zusatz von Phosphatpufferlösung pH 5 (WALDI, 1965)

Laufmittel: n-Butanol/Aceton/Phosphatpufferlösung pH 5 (40 : 50 : 1) (WALDI, 1965)

Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (0,5 ml Anisaldehyd werden in eine Mischung von 9 ml Äthanol, 0,5 ml konz. Schwefelsäure und 0,1 ml Eisessig gegeben) (STAHL u. KALTENBACH, 1961). Nach dem Besprühen wird 5 Min. lang bei 110°C erwärmt.

1.5. Steringlykoside, Acylsteringlykoside und Triterpensäuren

System XIII: Chloroform/Methanol (6 : 1)
(EICHENBERGER u. GROB, 1970)

System XIV : Toluol/Aceton (7 : 3) (HÄNSEL u. KUSSMAUL, 1975)

System XV : Chloroform/Methanol (9 : 0,3)

System XVI : Essigsäureäthylester/Methanol (19 : 1)
Die Detektion erfolgte entweder mit Molybdatophosphorsäure-Reagenz oder LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz.

2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur präparativen Trennung geringer Substanzmengen wurden Aluminium-Folien mit Kieselgel 60 F_{254} (MERCK) verwendet. Pro Folie wurden ca. 8 mg Substanz mit Hilfe des DESAGA-Mikrodosers nach DIBBERN aufgetragen. Nach Entwicklung der Folien wurde in der Mitte ein Streifen herausgeschnitten, detektiert und wieder in die Folie eingesetzt. In Anlehnung an diesen Streifen wurden die entsprechenden Zonen aus den Folien ausgeschnitten und die Substanzen mit einem geeigneten Elutionsmittel (z.B. Chloroform bei Kieselgel-$AgNO_3$-Platten, Chloroform/Methanol 1 : 1, Dichlormethan/Methanol 9 : 1) durch Übertropfen der Streifen eluiert. Da das Kieselgel sehr fest an den Folien haftet, bleibt das Eluat nahezu frei von Kieselgelpartikeln. Zur Abtrennung letzter Adsorbenspartikel wurde die eingeengte Lösung durch eine Filterspritze gegeben (vgl. DIBBERN und Mitarb., 1971).

3. Präparative Dickschichtchromatographie

Die Auftrennung größerer Substanzmengen erfolgte an 0,75 mm starken Dickschichtplatten. Zur Herstellung von drei 0,75 mm dicken Platten wurden 40 g Adsorbens mit 80 g Wasser angerührt, die Platten nach Beschichten 5-6 Std. an der Luft

getrocknet und danach 2 Std. lang bei 120°C im Trockenschrank aktiviert. Pro Platte wurden 80-100 mg Substanz mit dem DESAGA-Mikrodoser nach DIBBERN aufgetragen. Die Lokalisierung der gesuchten Zonen erfolgte durch Detektion eines schmalen Mittelstreifens der Platte, nachdem der Rest sorgfältig abgedeckt und gegen Erhitzen geschützt worden war. Aus den ausgekratzten Adsorbenszonen wurden die Substanzen 5 mal mit der ca. 10 fachen Menge eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2 : 1) auf dem Magnetrührer eluiert. Nach Abziehen des Elutionsmittels am Rotavapor wurden die Substanzen in einer kleinen Menge eines geeigneten Lösungsmittels aufgenommen und zur Entfernung von Kieselgelresten durch eine Filterspritze filtriert.

4. Säulenchromatographie

Als Adsorbentien wurden Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie 230-400 mesh (MERCK) und Aluminiumoxid neutral (WOELM) der Aktivitätsstufe II verwendet.
Die Füllung der Säulen erfolgte nach Suspension des Adsorbens im Elutionsmittel. Das zu trennende Substanzgemisch wurde, an Kieselgel oder Aluminiumoxid (1 : 1) adsorbiert, auf die Säule gegeben und mit Seesand p.a. abgedeckt.
Bei der Anwendung der Trockensäulenchromatographie (s. LOEV u. GOODMAN, 1967) wurde Kieselgel für Trockensäulen (Silica WOELM, TSC) verwendet. Dieses wurde nach 3 stündigem Equilibrieren mit dem Fließmittelgemisch in die Schlauchfolie "Rilsan" (Chemische Fa. BUBENHEIM) gefüllt. Das zu trennende Substanzgemisch wurde, an der 3 fachen Menge Kieselgel

adsorbiert, auf die Säule gegeben. Anschließend wurde solange Elutionsmittel auf die Säule gegeben, bis die Fließmittelgrenze das untere Säulenende erreicht hatte. Die mit der Rasierklinge herausgetrennten Zonen wurden mit einem Chloroform/Methanol-Gemisch (2 : 1) wie bei der präparativen Dickschichtchromatographie auf dem Magnetrührer eluiert.

5. Gaschromatographie

5.1. Geräte

Verwendet wurden der Gaschromatograph F 22 in Kombination mit dem Schreiber Typ 56 und dem Integrator M-1 der Fa. PERKIN-ELMER sowie der Gaschromatograph Typ 5710 A mit dem Schreiber 7123 A der Fa. HEWLETT-PACKARD. Der Papiervorschub betrug jeweils 1 cm/Min.. Als Trägergas diente gereinigter Stickstoff. Beide Geräte waren mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet.

5.2. Gaschromatographische Trennsysteme

System I : Stahlsäule (Fa. PERKIN-ELMER), Länge 2 m, Durchmesser 2 mm, Stationäre Phase: 3% Silikongummi SE-30 auf Chromosorb W, AW-DMCS, 80-100 mesh
Injektor- und Detektortemperatur: 270°C bzw. 300°C

System II : Glassäule (Fa. PERKIN-ELMER), Länge 2 m, Durchmesser 2,5 mm, Stationäre Phase: 3 % Silikonöl OV-17 auf Gas-Chrom Q, 100-120 mesh
Injektor- und Detektortemperatur: 280°C bzw. 300°C

System III : Glassäule (Fa. PACKARD), Länge 2 m,
Durchmesser 3 mm, Stationäre Phase: 3 % Fluorsilikonöl QF-1 auf Chromosorb W, HP, 80-100 mesh
Injektor- und Detektortemperatur: 250°C bzw. 300°C

System IV : 1 Paar Stahlsäulen (Fa. SUPELCO), Länge 2 m,
Durchmesser 2 mm, Stationäre Phase: 10 % Diäthylenglykolsuccinat DEGS auf Supelcoport, 80-100 mesh
Injektor- und Detektortemperatur: 230°C bzw. 230°C

System V : Glassäule (Fa. PACKARD), Länge 2 m,
Durchmesser 3 mm, Stationäre Phase: 3 % Silikonöl OV 225 auf Gas-Chrom Q, 100-120 mesh
Injektor- und Detektortemperatur: 200°C bzw. 250°C

System VI : Glassäule (Fa. PACKARD), Länge 2 m,
Durchmesser 3 mm, Stationäre Phase: 3 % Nitrilsilikonöl XE-60 auf Chromosorb W, AW-DMCS, 80-100 mesh
Injektor- und Detektortemperatur: 200°C bzw. 300°C

System VII : Kapillarsäule (Fa. MACHEREY-NAGEL), Länge 6 m,
Stationäre Phase: Silikonöl OV-101
Injektor- und Detektortemperatur: 270°C bzw. 300°C

5.2.1. GC der Triterpene

System I : Säulentemperatur: 250°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 30 ml N_2/Min.
RT Cholesterinacetat: 19,4 Min.

System II : Säulentemperatur: 260°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 50 ml N_2/Min.
RT ß-Sitosterin: 28 Min.

System III : Säulentemperatur: 250°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 40 ml N_2/Min.
RT Cholesterinacetat: 12,3 Min.

System VII : Säulentemperatur: 230°C, isotherm
Trägergas: Helium 1 bar

5.2.2. GC der Methylsterine

System II : Säulentemperatur: 270°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 50 ml N_2/Min.
RT ß-Sitosterin: 22 Min.

5.2.3. GC der Sterine

System I : Säulentemperatur: 250°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 26 ml N_2/Min.
RT Cholesterin: 16,5 Min.
RT Cholesterinacetat: 22 Min.

System II : Säulentemperatur: 270°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 30 ml N_2/Min.
RT ß-Sitosterin: 28,5 Min.

System VI : Säulentemperatur: 235°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 25 ml N_2/Min.
RT Cholesterinacetat: 29 Min.

5.2.4. GC der Fettsäuren

System IV : Säulentemperatur: 80-180°C, programmiert,
Temperaturanstieg: 6°C/Min., danach isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 30 ml N_2/Min.
RT Palmitinsäuremethylester: 16 Min.

5.2.5. GC der Alkane

System I : Säulentemperatur: 230°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 26 ml N_2/Min.
RT n-Tetracosan: 5,1 Min.

System I : Säulentemperatur: 190-270°C, programmiert,
Temperaturanstieg: 2°C/Min.
Strömungsgeschwindigkeit: 26 ml N_2/Min.
RT n-Tetracosan: 15,2 Min.

5.2.6. GC der primären aliphatischen Alkohole

System II : Säulentemperatur: 260°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 30 ml N_2/Min.
RT Pentacosanol-1: 7,6 Min.
RT Pentacosanol-1-acetat: 9,9 Min.

5.2.7. GC der sekundären aliphatischen Alkohole

System I : Säulentemperatur: 250°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 30 ml N_2/Min.
RT Cholesterin: 12,6 Min.

5.2.8. GC der Triterpensäuren

System II : Säulentemperatur: 280°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml N_2/Min.
RT Cholesterin: 8,7 Min.

5.2.9. GC der Zucker

System V : Säulentemperatur: 190°C, isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 40 ml N_2/Min.
RT Glucitolacetat: 35,9 Min.

IV. Derivatisierungen

1. Acetatbildung

Die Darstellung der jeweiligen Acetylderivate erfolgte nach der von MATSUO und Mitarb. (1972) beschriebenen Methode. 50 mg der entsprechenden Substanz wurden in einer Mischung von 1,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Verdünnen des Reaktionsgemisches mit ca. 15 ml Wasser wurden die Acetate 5 mal mit jeweils 3 ml Petroläther (40-60°C) extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. wurde das Lösungsmittel am Rotavapor abgezogen. Notwendige Reinigungen erfolgten durch Umkristallisation, durch SC an Kieselgel oder präparative DC an Kieselgel-Alufolien.

2. Bildung der Methylester

Einige mg der Fettsäuren wurden in wenig Äther, die Triterpensäuren in Äther unter geringem Zusatz von Methanol gelöst und mit überschüssiger, ätherischer Diazomethanlösung (bleibende Gelbfärbung) versetzt. Nach 24 Std. wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Die anschließende Reinigung erfolgte durch Umkristallisation bzw. bei den Fettsäuremethylestern durch präparative DC.
Zur Herstellung der ätherischen Diazomethanlösung wurden

10 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid (MERCK) in 100 ml Äther gegeben und mit einer Kältemischung auf ca. -15°C gekühlt. Anschließend wurde die Lösung in kleinen Anteilen mit 70 ml 0,75 n äthanolischer Natronlauge versetzt, wobei die Temperatur unter -5°C gehalten wurde. Nach 10 Min. wurde die ätherische Diazomethanlösung in eine gekühlte Vorlage überdestilliert. Die Lösung bleibt bei kühler Aufbewahrung mehrere Tage gebrauchsfertig.

3. Bildung der Alditolacetate

Die Reduktion der Zucker und die anschließende Acetylierung wurden in Anlehnung an JANSSON und Mitarb. (1976) durchgeführt.

1,2 mg Zucker wurden in 2 ml H_2O gelöst und mit 3 mg $NaBH_4$ versetzt. Nach 3 Std. wurde die Lösung mit saurem Ionenaustauscher (Dowex 50) auf pH 3,5 gebracht, filtriert, im Vakuum eingedampft, 2 ml Methanol zugesetzt und erneut destilliert. Die Methanoldestillation wurde 3 mal wiederholt. Die nun wasserfreie Probe wurde mit 0,2 ml eines Gemisches aus Pyridin/Acetanhydrid (1 : 1) versetzt und 3 Std. bei 100°C erhitzt (Ölbad).

V. Herkunft und Ernte der Pflanzen

Die Blätter von Symphoricarpus albus wurden von natürlichen Wuchsorten in Vechta zur Blütezeit in den Monaten Juli und August 1977 geerntet und an der Luft getrocknet. Der Trocknungsverlust betrug ca. 83 %.

Die Früchte von S. albus stammten von natürlichen Wuchsorten (Vechta, Düsseldorf, Dortmund) (Ernte August bis Oktober 1978). Ihre Trocknung erfolgte im Trockenschrank bei 60°C. Trocknungsverlust: ca. 89 %.
Die für die DC-Untersuchung herangezogenen Blätter von S. albus, L. periclymenum, V. opulus und S. nigra wurden zur Zeit der Fruchtreife im Oktober 1979 an natürlichen Wuchsorten in Düsseldorf geerntet und an der Luft getrocknet. Die jeweils hergestellten Petroläther- und Acetonextrakte wurden bis zur Aufarbeitung bei -20°C über Stickstoff aufgehoben.

VI. Der Petrolätherextrakt der Blätter

1. Herstellung des Petrolätherextraktes und seines unverseifbaren Anteils

1400 g getrocknete und gemahlene Blätter von S. albus wurden im Soxhlet mit Petroläther (40-60°C) erschöpfend extrahiert. Ausbeute: 46,1 g, entsprechend 3,29 % vom Blatt-Trockengewicht.
0,456 g des Petrolätherextraktes wurden nach Angaben von SCHREIBER u. OSSKE (1962) mit 6 ml methanolischer KOH (125 g KOH, 60 g H_2O, 800 g CH_3OH) 150 Min. lang am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 6 ml H_2O wurde erneut 30 Min. unter Rückflußkühlung gekocht. Nach dem Erkalten wurde das Hydrolysat 5 mal mit je 5 ml Petroläther (40-60°C) und dann 5 mal mit je 5 ml Petroläther/Äther (1 : 1) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit H_2O und einmal mit 50 % igem Methanol

gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 sicc. getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum blieben 0,212 g Unverseifbares zurück, entsprechend 1,5 % vom Blatt-Trockengewicht.

2. Fraktionierung des Petrolätherextraktes

2.1. Auftrennung durch Säulenchromatographie

10 g Petrolätherextrakt wurden an 1000 g Aluminiumoxid (neutral, Aktivitätsstufe II) chromatographiert (Länge der Säule: 70 cm, innerer Durchmesser: 4,3 cm). Eluiert wurde zunächst mit 2000 ml Petroläther (40-60°C), dann mit Petroläther/Benzol-Gemischen, wobei nach jeweils 500 ml 5 % Benzol mehr zugegeben wurden. Die weitere Elution erfolgte mit 500 ml reinem Benzol und Benzol/Äthylacetat-Gemischen, deren Äthylacetatanteil nach jeweils 500 ml um 10 % gesteigert wurde. Zum Schluß wurde mit 500 ml Äthylacetat eluiert und die dann noch auf der Säule verbliebene Substanz mit Methanol heruntergewaschen. Es wurden Fraktionen von 18 ml aufgefangen, im DC-System I analysiert und die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Das Ergebnis dieser Trennung ist Tabelle 25 zu entnehmen.

Tabelle 25 : Säulenchromatographische Auftrennung von 10 g Petrolätherextrakt der Blätter an Aluminiumoxid neutral (WOELM), Aktivitätsstufe II

Fraktion	vereinigt zu	Elutions-mittel	Gramm	Hauptkomponenten
46 - 71	A	Petroläther	0,76	Kohlenwasser-stoffe
72 - 309		Petroläther/ Benzol	0,80	nicht identifi-zierte Substanzen
310 - 662	B	Petroläther/ Benzol; Benzol	1,98	Triterpen-, Methyl-sterin-, Sterin-ester, Ester aliph. Alkohole
663 - 686	C	Benzol; Benzol/ Äthylacetat	1,44	sekundäre Alkohole, nicht identifi-zierte Substanzen
687 - 711		Benzol/ Äthylacetat	0,50	nicht identifi-zierte Substanzen
712 - 749	D	Benzol/ Äthylacetat	1,14	Triterpene, Methyl-sterine, aliph. Alkohole
750 - 820	E	Benzol/ Äthylacetat	0,81	Sterine, nicht identifizierte Substanzen
821 -1056		Benzol/ Äthylacetat; Äthylacetat	0,52	nicht identifi-zierte Substanzen
Rest		Methanol	1,75	nicht identifi-zierte Substanzen

2.2. Auftrennung durch Trockensäulenchromatographie

9 g Petrolätherextrakt wurden an 3 Kieselgel-Trockensäulen aufgetrennt, wobei jeweils 3 g Extrakt an 500 g Adsorbens in einer Schlauchfolie chromatographiert wurden (Länge der Säule: 1,10 m, Durchmesser: 3 cm). Die Entwicklung der Säule erfolgte mit 600 ml eines Toluol/Petroläther (40-60°C)-Gemisches (65 : 35). Die DC-Überprüfung der nach Elution erhaltenen Fraktionen erfolgte in den DC-Systemen I und II. In Tabelle 26 ist das Ergebnis der Trennung wiedergegeben.

Tabelle 26 : Auftrennung von 9 g Petrolätherextrakt der Blätter an Kieselgel für Trockensäulen (Silica WOELM, TSC), Elutionsgemisch: Toluol/Petroläther (65 : 35)

Fraktion	Gramm	Hauptkomponenten
F	2,50	Kohlenwasserstoffe, Triterpen-, Methylsterin-, Sterinester, Ester aliph. Alkohole
G	0,39	Triterpen-, Methylsterin-, Sterinester, Ester aliph. Alkohole (DC ein Fleck)
H	0,45	Triterpenester, Ester aliph. Alkohole, nicht identifizierte Alkohole
	1,00	sekundäre Alkohole
J	1,46	Triterpene, Methylsterine, Sterine, aliphatische Alkohole
	3,10	nicht identifizierte Substanzen

3. Triterpene, Methylsterine und Sterine

3.1. Isolierung der Triterpene, Methylsterine und Sterine aus den Esterfraktionen F, G und H

Die Esterfraktion F (2,50 g) wurde mit 500 ml methanolischer KOH, wie bei der Herstellung des Unverseifbaren angegeben, hydrolysiert. Nach Erkalten wurden dem Verseifungsansatz durch 6 malige Extraktion mit jeweils 150 ml Petroläther (40-60°C) 2,03 g neutrale Bestandteile entzogen.

Zur Isolierung der im DC-System I nachgewiesenen Triterpene, Methylsterine und Sterine wurden diese an 200 g Kieselgel mit 2400 ml eines Gemisches aus Petroläther/Essigsäureäthylester/Toluol (80 : 15 : 5) sc aufgetrennt. Erhaltene Fraktionen: 25,7 mg Triterpene, 15,3 mg Methylsterine und 35,7 mg Sterine. Die Methylsterine und Sterine fielen dc rein an.

Die Triterpenfraktion wurde erneut an 10 g Kieselgel mit Toluol/Petroläther (65 : 35) chromatographiert. Nach dieser Reinigung lagen 17,4 mg Triterpene dc einheitlich vor.

Die Esterfraktion G (390 mg) wurde wie Fraktion F mit 125 ml methanolischer KOH verseift. Ausbeute an neutralen Bestandteilen: 304 mg.

Diese wurden an 25 g Kieselgel mit 300 ml des bei Fraktion F angegebenen Elutionsmittelgemisches chromatographiert. Hierbei wurden 5 mg einer dc reinen kristallinen Triterpenfraktion erhalten, die nach der gc Analyse keine aliphatischen Alkohole enthielt. Die danach anfallenden Triterpene (62,7 mg) wurden erneut an 10 g Kieselgel mit dem Elutionsgemisch Toluol/Petroläther (65 : 35) gereinigt. Danach lagen 58 mg dc einheitliche Triterpene von wachsartiger Konsistenz vor, in der

gc neben den Triterpenen auch aliphatische Alkohole nachgewiesen wurden. Die erhaltene Methylsterinfraktion (26,5 mg) wurde durch präparative DC im System I weiter gereinigt. Ausbeute: 9,4 mg dc einheitliche Methylsterine. Die Sterine, die in einer weiteren Fraktion von der Säule eluiert wurden, waren dc rein. Ausbeute: 26,4 mg.

Fraktion H (450 mg) wurde in gleicher Weise hydrolysiert und aufgetrennt: neutrale Bestandteile 343 mg; nach SC erhaltene dc einheitliche Triterpene: 11,2 mg.

Die drei isolierten Triterpen-, Methylsterin- und Sterinfraktionen erwiesen sich nach DC- und GC-Analyse als jeweils identisch und wurden vereinigt. Für die weiteren Analysen lagen danach vor: 86,6 mg Triterpene, verunreinigt mit aliphatischen Alkoholen, 5,0 mg kristalline Triterpene ohne aliphatische Alkohole, 24,7 mg Methylsterine und 62,1 mg Sterine.

Bei dem Hauptteil der nach alkalischer Hydrolyse erhaltenen neutralen Bestandteile handelte es sich jeweils um eine Substanz, die im DC unverändert in der Esterzone erschien (hRf 96, DC-System I). Offenbar liegen hier Wachse vor, die erst bei längerer, saurer Hydrolyse gespalten werden (s. WILLUHN u. RICHTER, 1977).

3.2. Isolierung der frei vorliegenden Triterpene, Methylsterine und Sterine

Zur Isolierung der frei vorliegenden Triterpene und Methylsterine wurde die Fraktion J (1,46 g) an 100 g Kieselgel mit Petroläther/Essigsäureäthylester/Toluol (80 : 15 : 5)

chromatographiert. Ergebnis: 76,3 mg dc einheitliche Triterpene, 58,9 mg noch verunreinigte Triterpene. Die Reinigung dieser Fraktion erfolgte sc an 10 g Kieselgel mit Petroläther/Toluol (35 : 65). Ausbeute an dc einheitlichen Triterpenen: 25,7 mg.

Insgesamt konnten so 102 mg freie Triterpene erhalten werden, deren wachsartige Konsistenz auf das Vorliegen von aliphatischen Alkoholen hindeutete, was durch gc Analyse bestätigt wurde. Ihre Abtrennung erfolgte durch Harnstoffadduktbildung (s. Isolierung der aliphatischen Alkohole S. 192). Ausbeute an Triterpenalkoholen: 30 mg.

Die sc Auftrennung der Fraktion J lieferte weiter 21,8 mg einer Methylsterinfraktion, die durch präparative DC im System I gereinigt wurde. Ausbeute: 5,1 mg Methylsterine.

Zur Isolierung der freien Sterine wurde Fraktion E herangezogen, von der 339 mg an 25 g Kieselgel mit 950 ml eines Gemisches aus Benzol/Äther (9 : 1) sc aufgetrennt wurden. Es fielen 173,6 mg dc einheitliche Sterine an (Schmp. 132-134°C, aus Aceton).

Auf diese Weise wurden an frei vorliegenden Verbindungen erhalten: 30 mg Triterpene, 5,1 mg Methylsterine und 173,6 mg Sterine.

3.3. DC-Trennung der verestert und frei vorliegenden Triterpene nach Acetylierung

40 mg der aus der Esterfraktion erhaltenen Triterpene wurden acetyliert und anschließend an 10 g Kieselgel mit Petroläther/Essigsäureäthylester/Toluol (80 : 15 : 5) gereinigt. Danach lagen 35 mg

dc reine acetylierte Triterpene vor, die durch präparative DC an mit 20 % Silbernitrat imprägnierten Kieselgelfolien aufgetrennt wurden. Pro Folie wurden 7 mg mit dem Mikrodoser strichförmig aufgetragen und im DC-System V 2 mal über die Laufstrecke von 11 cm chromatographiert. Die Isolierung und Rückgewinnung der Substanzen erfolgte wie bei der präparativen DC beschrieben. Nach erneuter Reinigung der erhaltenen Fraktionen unter den gleichen Bedingungen wurde folgendes Ergebnis erzielt: Fraktion I (hRf 60): 0,8 mg; Fraktion II (hRf 68): 2 mg; Fraktion III (hRf 71): 0,9 mg; Fraktion IV (hRf 78): 10,5 mg; Fraktion V (hRf 86): 8,2 mg.

Die präparative DC-Trennung der frei vorliegenden Triterpene (30 mg) erfolgte analog. Ergebnis: Fraktion I (hRf 60): 1,2 mg; Fraktion II (hRf 68): <0,1 mg; Fraktion III (hRf 71): <0,1 mg; Fraktion IV (hRf 78): 1,8 mg; Fraktion V (hRf 86): 26 mg.

4. Fettsäuren der Esterfraktion G

4.1. Isolierung

Nach Abtrennung des unverseifbaren Anteils aus dem Hydrolysat der Fraktion G wurde dieses mit HCl auf pH 1 gebracht und die Fettsäuren durch 5 maliges Ausschütteln mit jeweils 50 ml Petroläther (40-60°C) extrahiert. Ausbeute: 64,7 mg.

4.2. Auftrennung in gesättigte und ungesättigte FSME nach Quecksilber-II-acetat-Adduktbildung

50 mg der FSME wurden in einer Mischung aus 0,7 g Hg(II)-acetat, 12,5 ml Methanol, 0,13 ml H_2O und 0,05 ml Eisessig

gelöst und 24 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 9 ml Chloroform suspendiert und überschüssiges Hg(II)-acetat anschließend durch 4 maliges Ausschütteln mit je 4 ml H_2O entfernt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. wurde die Chloroformphase bei Zimmertemperatur im Vakuum entfernt.
Die Trennung erfolgte an 6 Kieselgel H/Kieselgur-Platten (3 : 7) im System VIII. Die an die Fließmittelfront gewanderten gesättigten FSME wurden nach Abschaben von der Platte mit Chloroform/Methanol (4 : 1) aus dem Adsorbens eluiert. Die am Start liegengebliebenen Hg(II)-acetat-Addukte der ungesättigten FSME wurden von der Platte gekratzt und ohne vorherige Abtrennung des Adsorbens zur Spaltung der Addukte in 3 ml einer Lösung von 5 % Ammoniumthiocyanat in Methanol und 0,4 ml Salzsäure (37 % ig) gegeben und unter mehrmaligem Umschütteln 1 Std. lang im Dunkeln stehengelassen. Nach Zusatz von 15 ml Wasser wurde der Ansatz 3 mal mit 6 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. wurde das Lösungsmittel abgezogen.

4.3. Hydrierung der ungesättigten FSME

Die ungesättigten FSME wurden in etwa 1 ml peroxydfreiem Tetrahydrofuran gelöst (Entfernung der Peroxyde durch SC an neutralem Al_2O_3), und nach Zusatz von Platin-IV-oxid als Katalysator durch Einleiten von gereinigtem Wasserstoff hydriert. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurden die FSME in wenig Petroläther aufgenommen und durch Filtration vom Katalysator befreit.

5. Alkane

Die Kohlenwasserstoff-Fraktion (Fraktion A, s. Tab. 25, S. 185) wurde durch Harnstoffadduktbildung von eventuell vorhandenen cyclischen Kohlenwasserstoffen und verzweigten Alkanen gereinigt. Die Adduktbildung und Spaltung erfolgte wie bei den aliphatischen Alkoholen beschrieben (s. 6.) Von 190 mg der Fraktion A blieben 5,4 mg (= 2,8 %) unfällbar im Filtrat zurück. Nach der Spaltung der Addukte wurden 160 mg Alkane erhalten, die nach Umkristallisation aus Äthanol bei 62-64°C schmolzen.

6. Isolierung der primären aliphatischen Alkohole über Harnstoffadduktbildung

102 mg der die Triterpene und aliphatischen Alkohole enthaltende Fraktion (s. S. 45) wurden in 2 ml Benzol gelöst, auf 60°C erwärmt und in 20 ml einer gleichwarmen übersättigten Harnstofflösung (100 g Harnstoff + 180 ml Methanol) unter Umschütteln gegeben. Der Ansatz wurde bis zum Erkalten auf dem Magnetrührer gerührt und zur vollständigen Kristallisation über Nacht in den Kühlschrank gestellt.
Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mehrmals mit kleinen Mengen eiskalter methanolischer Harnstofflösung gewaschen und zur Sprengung der Addukte in 20 ml heißes Wasser gegeben. Die abgeschiedenen aliphatischen Verbindungen wurden nach Erkalten und Sättigen der wäßrigen Phase mit NaCl 4 mal mit je 15 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. und Abziehen des Lösungsmittels fielen 55 mg primäre aliphatische Alkohole an (Schmp. 57-60°C).

Das Filtrat und die Waschflüssigkeiten wurden vereinigt und mit der 4 fachen Menge einer gesättigten wäßrigen NaCl-Lösung verdünnt. Die dabei auftretende Benzolphase wurde im Scheidetrichter abgetrennt und die wäßrig-methanolische Phase 4 mal mit je 10 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. im Vakuum zur Trockene gebracht. Rückstand: 30 mg Triterpene.

7. Sekundäre aliphatische Alkohole

7.1. Isolierung

265 mg der Fraktion C (s. Tab. 25,S. 185) wurden an 25 g Kieselgel mit 500 ml eines Gemisches aus Petroläther (40-60°C)/ Benzol (35 : 65) chromatographiert. Es fielen neben 50 mg einer noch leicht verunreinigten Fraktion 153 mg dc einheitliche sekundäre aliphatische Alkohole an (Schmp. 78-80°C).

7.2. Oxidation zu Ketonen

27 mg der sekundären Alkohole wurden in 4 ml Eisessig suspendiert und zu einer Lösung von 20 mg CrO_3 in 2 ml Eisessig gegeben. Nach 10 Min. bei 60°C im Wasserbad wurde 5 mal mit 10 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. wurde das Lösungsmittel abgezogen (s. BROWN u. GARG, 1961; MATSUO und Mitarb., 1972).
Es fielen 22 mg eines leicht verunreinigten Ketongemisches an, das an Kieselgel mit Toluol als Elutionsmittel chromatographiert wurde. Danach lagen 17 mg eines reinen Ketongemisches vor (Schmp. 68-71°C).

7.3. Reduktion zu Alkanen

15 mg der sekundären Alkohole wurden zusammen mit 15 mg Jod und 5 g rotem Phosphor in einer zugeschmolzenen Ampulle 3 Std. lang auf 100°C erwärmt (Ölbad). Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsgemisch mit Petroläther extrahiert und die Lösung nach Filtration über eine kleine Kieselgel-Säule mit 5 ml 0,5 n methanolischer HCl unter Zufügen von 300 mg Zinkstaub 2 Std. lang am Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde erneut mit Petroläther extrahiert und die Lösung zur Reinigung über eine kleine Kieselgel-Säule filtriert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. und Abziehen des Petroläthers lagen 9,6 mg einer dc einheitlichen Kohlenwasserstoff-Fraktion vor.

VI. Der Acetonextrakt der Blätter

1. Herstellung des Acetonextraktes und seines unverseifbaren Anteils

1400 g getrocknete, gemahlene und mit Petroläther entfettete Blätter (s. S. 183) wurden erschöpfend mit Aceton extrahiert. Ausbeute: 118 g = 8,4 % vom Blatt-Trockengewicht.
10 g des entfetteten Acetonextraktes wurden 5 Std. lang mit 250 ml äthanolischer Schwefelsäure (3 % H_2SO_4 in 50 % igem Äthanol), anschließend nach Zugabe von 30 g KOH erneut 30 Min. lang am Rückfluß erhitzt. Danach wurde der Alkohol weitgehend im Vakuum abgedampft und der unverseifbare Anteil durch 5 maliges Ausschütteln mit je 50 ml Petroläther (40-60°C)/Äther (1 : 1) gewonnen. Die vereinigten Auszüge wurden nach Einengen mit H_2O, dann mit Methanol/H_2O (1 : 1)

gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 sicc. wurde die Lösung im Vakuum zur Trockene gebracht. Ausbeute: 0,72 g unverseifbarer Anteil (= 0,6 % des Blatt-Trockengewichtes).

2. Isolierung der Sterine aus dem Unverseifbaren des Acetonextraktes

Der unverseifbare Anteil (0,72 g) wurde an 60 g Kieselgel mit 1400 ml Chloroform/Äthanol (99 : 1) als Elutionsmittel aufgetrennt. Es wurden 224 mg einer mit Sterinen angereicherten Fraktion erhalten, die sc weiter an 25 g Kieselgel mit 400 ml Petroläther/Essigsäureäthylester/Toluol (80 : 15 : 5) gereinigt wurde. Danach lagen 50 mg dc reine Sterine vor (Schmp. 133-135°C, aus Aceton).

3. Steringlykoside und Acylsteringlykoside

3.1. Isolierung

6 g Acetonextrakt wurden an Kieselgel G im System XIII durch präparative Dickschichtchromatographie aufgetrennt. Es wurden 249 mg einer Steringlykosid-Fraktion und 364 mg einer Acylsteringlykosid-Fraktion erhalten, die jeweils an 25 g Kieselgel sc gereinigt wurden. Als Elutionsmittel diente Chloroform, dem mit 1 % iger Steigerung bis zu 8 % Methanol zugesetzt wurde (OKUDA und Mitarb., 1975; GRUNWALD, 1978). Ergebnis: 11,9 mg dc reine Acylsteringlykoside (Schmp. 130-133°C).

Die anfallenden Steringlykoside wurden durch präparative DC an Kieselgel im System XIII weiter gereinigt. Danach lagen 17,6 mg dc einheitliche Steringlykoside vor (Schmp. 260-262°C).

3.2. Identifizierung der Acylsteringlykoside

3.2.1. Alkalische Hydrolyse

7,8 mg Acylsteringlykoside wurden 30 Min. lang mit 10 ml einer 10 % igen methanolischen KOH-Lösung am Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 3 ml Wasser wurden durch 3 maliges Ausschütteln mit je 5 ml Chloroform und anschließendem Waschen der Chloroformphase mit Wasser 4,2 mg Steringlykoside erhalten, die nach Umkristallisation aus Methanol bei 262-265°C schmolzen.

Das Hydrolysat wurde mit Salzsäure auf pH 1-2 gebracht und 3 mal mit 5 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt. Ausbeute: 2 mg Fettsäure.

3.2.2. Saure Hydrolyse

Die nach alkalischer Hydrolyse der Acylsteringlykoside erhaltenen Steringlykoside (4,2 mg) wurden mit 5 ml einer 2 n Salzsäure 4 Std. lang am Rückfluß erhitzt und die Sterine dem Hydrolysat durch Ausschütteln mit Petroläther (3 mal mit je 5 ml) entzogen. Ausbeute: 3 mg.

Zum Nachweis der Zucker wurde das wäßrige Hydrolysat mit stark basischem Ionenaustauscher neutralisiert und am Rotavapor im Vakuum eingeengt.

3.3. Hydrolyse der Steringlykoside

8 mg Steringlykoside wurden, wie unter 3.2.2. angegeben, sauer hydrolysiert.

4. Isolierung der Triterpensäuren

12 g Acetonextrakt wurden an 2 Säulen mit jeweils 450 g Kieselgel aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente Chloroform, dem steigende Mengen an Methanol zugesetzt wurden. Die aufgefangenen 20 ml-Fraktionen wurden in den Systemen XIII und XIV dc untersucht. Tabelle 27 gibt das Ergebnis der Trennung wieder.

Tabelle 27 : Fraktionierung des Acetonextraktes

Elutionsmittel	Hauptkomponenten	Gramm
Chloroform	Ursol- und Oleanolsäure	0,15
Chloroform + 1 % Methanol	Ursol- und Oleanolsäure, unbekannte Substanzen	0,19
	unbekannte Substanzen	0,38
Chloroform + 2 % Methanol	Acylsteringlykoside, 2α-Hydroxyursolsäure	0,28
Chloroform + 4 % Methanol	unbekannte Substanzen	0,30
Chloroform + 8 % Methanol	unbekannte Substanzen	2,82
Chloroform + 12 % Methanol	Steringlykoside	0,34
Methanol	unbekannte Substanzen	6,70

Die die Ursol- und Oleanolsäure enthaltende Fraktion (150 mg) wurde erneut an einer kleinen Säule mit 20 g Kieselgel mit dem gleichen Elutionsmittel chromatographiert. Danach lagen 100 mg dc reine Ursol- und Oleanolsäure vor.
280 mg der die 2α-Hydroxyursolsäure und die Acylsteringlykoside enthaltende Fraktion wurden an 25 g Kieselgel mit Chloro-

form und steigenden Mengen an Methanol sc aufgetrennt. Auch danach lag die 2α-Hydroxyursolsäure noch mit geringen Mengen der Acylsteringlykoside verunreinigt vor. Sie wurde deshalb einer präparativen DC im System XIV unterworfen. Ergebnis: 83 mg 2α-Hydroxyursolsäure, dc einheitlich, Schmp. 245-247°C.

VII. Quantitative Bestimmungen

1. Quantitative Bestimmung der Ursol- und der Oleanolsäure

1.1. Herstellung der Extrakte

Für die quantitative Bestimmung der Ursol- und Oleanolsäure wurden 25,0 g getrocknete und gepulverte Blätter mit Aceton erschöpfend im Soxhlet extrahiert. Der gewonnene Extrakt (3,19 g = 12,8 % des Blatt-Trockengewichtes) wurde zu 100 ml in einem Gemisch von Chloroform/Methanol (2 : 1) gelöst. 1,00 ml dieser Lösung enthielt so 31,9 mg Extrakt, entsprechend 0,25 g Droge.

1.2. Durchführung der Messung

1,00 ml der Extraktlösung wurde auf 2 Kieselgelfolien mit dem Desaga-Mikrodoser nach DIBBERN aufgetragen und im System XV chromatographiert. Die Zone, die auf gleicher Höhe wie mitchromatographierte Ursolsäure lag, wurde ausgeschnitten und mit Chloroform/Methanol (2 : 1) eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden in der auf S. 181 beschriebenen Weise methyliert und der Rückstand mit 2,00 ml einer Stigmasterinacetat-Maßlösung (10,0 mg zu 10,00 ml in Chloroform gelöst) versetzt. 0,5 µl dieser Lösung wurden in den Gaschromatographen

eingespritzt. Es wurden 2 Parallelanalysen durchgeführt. Der Korrekturfaktor für die im GC auftretenden Substanzpeaks wurde nach ACKMAN (1964; s. KAISER, 1965) nach der Formel:

$$F = \frac{M_1}{nb \times 12}$$

ermittelt.

Dabei bedeutet M_1 das Molekulargewicht der Substanz, nb die im Molekül "verfügbaren" Kohlenstoffatome. Darunter sind die C-Atome zu verstehen, die Protonen tragen. Als nicht verfügbar gelten die C-Atome, die neben einem H-Atom ein doppelt gebundenes Heteroatom oder kein H-Atom und ein zwei- bis dreifach gebundenes Heteroatom aufweisen. Solche Kohlenstoffe, die neben einem oder zwei Protonen eine Einfachbindung an Sauerstoff oder ein anderes Heteroatom zeigen, werden mit 0,3 bis 0,5 gewertet. Danach ergab sich für Ursolsäuremethylester ($C_{31}H_{50}O_3$; MG: 470,7) der Faktor 1,66, für Oleanolsäuremethylester 1,74 und für Stigmasterinacetat ($C_{31}H_{50}O_2$; MG: 454,7) der Faktor 1,44.

Die Gewichtsmenge der Substanz in mg berechnet sich aus dem Vergleich der Peakflächen (= Peakhöhe mal Peakbreite in halber Höhe) nach der Formel:

$$\text{mg Substanz A} = \frac{\text{Peakfläche A x Faktor A x mg Eicheinwaage}}{\text{Eichpeakfläche x Eichsubstanzfaktor}}$$

Zur Bestimmung der Fehlergrenze wurden 2,0 ml der Extraktlösung mit 2,0 mg Ursolsäure versetzt und derselben Behandlung unterworfen. Es wurden 1,86 mg Ursolsäure mehr gefunden als für den Extrakt allein ermittelt worden war. Das entspricht einem Isolationsverlust von 7 %.

2. Quantitative Bestimmung der Sterine, ihrer Ester und Glykoside

2.1. Erstellung der Eichkurve

Zur Aufstellung der Eichkurve wurden 10,00 mg der isolierten freien Sterine aus dem Petrolätherextrakt der Blätter zu 1,00 ml Chloroform gelöst und jeweils in zwei Ansätzen 20, 40, 60 und 80 µl in 6 cm lange Streifen auf DC-Alufolien aufgetragen und im DC-System I entwickelt. Die Zone, die in Laufhöhe von mitchromatographiertem Cholesterin lag, wurde ausgeschnitten und mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (4 : 1) in einen 50 ml Spitzkolben eluiert. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand nacheinander mit 1,00 ml Eisessig, 2,00 ml Essigsäureanhydrid und 0,10 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wurde unter häufigem Umschwen-

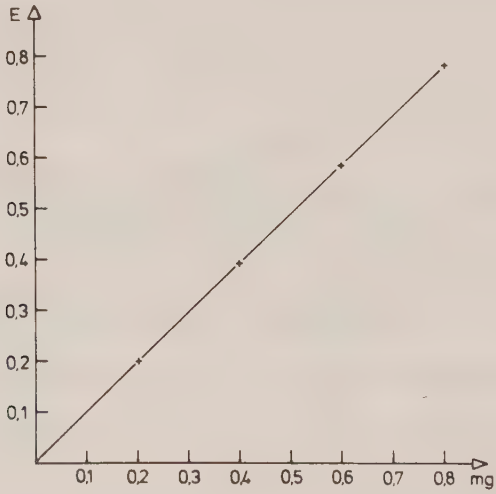


Abbildung 74 : Eichkurve für die photometrische Bestimmung der Sterine mit LIEBERMANN-BURCHARD-Reagenz

ken 30 Min. lang bei 24°C gehalten. Anschließend wurde die Extinktion in 10 mm Schichtdicke bei 680 nm Wellenlänge mit dem Spektralphotometer gemessen. Aus den gefundenen Werten wurde für jede der vier Sterinkonzentrationen der Mittelwert berechnet und in einem Diagramm aufgezeichnet. Die erhaltene Eichkurve ist in Abbildung 74 wiedergegeben. Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert betrug ± 2 %.

2.2. Herstellung der Extrakte

Für die Bestimmung der Gesamtsterine und der einzelnen Sterinderivate wurden drei Extrakte hergestellt:

Extrakt A: 25,0 g getrocknete und gepulverte Blätter wurden im Soxhlet mit Aceton erschöpfend extrahiert. Nach Einengen des Extraktes wurde dieser in einen Meßkolben überführt und mit Aceton zu 100,0 ml aufgefüllt.

1 ml Extrakt entsprach somit 0,25 g Droge.

Extrakt B: 25,0 g getrocknete und gemahlene Blätter wurden im Soxhlet mit Petroläther erschöpfend extrahiert, der eingeengte Extrakt in einen Meßkolben überführt und mit Petroläther zu 100,0 ml aufgefüllt.

Extrakt C: Der entfettete Drogenrückstand wurde anschließend mit Aceton erschöpfend extrahiert und der Extrakt in einem Meßkolben zu 50,0 ml gelöst.

2.3. Bestimmung der Gesamtsterine, der freien Sterine sowie der freien und veresterten Sterine aus dem Acetonextrakt (Extrakt A)

G e s a m t s t e r i n e : 20,00 ml Acetonextrakt wurden zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 25 ml 95 %igem

Äthanol unter Zusatz von 2 % Schwefelsäure gelöst und 15 Std. lang am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 15 ml einer 10 % igen äthanolischen Kalilauge zugesetzt und erneut 30 Min. lang zum Sieden erhitzt. Das Hydrolysat wurde nach Erkalten in einen Scheidetrichter überführt, 25 ml Petroläther (40-60°C) zugesetzt und dann soviel Wasser zugefügt, daß sich 2 Phasen bildeten. Nach Abtrennen des Petroläthers wurde die wäßrige Phase zunächst noch 3 mal und nach Zusatz von ca. 10 ml H_2O noch 2 mal mit jeweils 25 ml Petroläther ausgeschüttelt. Nach 2 maligem Waschen der vereinigten Petrolätherauszüge mit je 10 ml 90 % igem Methanol wurde das Lösungsmittel abgezogen. Zur quantitativen Bestimmung wurde der Rückstand in 2,00 ml Chloroform gelöst und jeweils 0,10 ml hiervon, wie bei der Erstellung der Eichkurve beschrieben, chromatographiert, eluiert und nach Reagenzzugabe photometrisch vermessen. Es wurden jeweils 3 Parallelanalysen durchgeführt. Aus der Extinktion wurde anhand der Eichkurve der Gehalt ermittelt und auf 100 g Droge bezogen.

F r e i e S t e r i n e : 20,00 ml Acetonextrakt wurden zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 25 ml 95 % igem Äthanol gelöst und, wie bei den Gesamtsterinen beschrieben, mit Petroläther extrahiert. Der Petrolätherrückstand wurde in 2,00 ml Chloroform gelöst, jeweils 0,10 ml hiervon zur photometrischen Bestimmung über DC-Platten aufgetrennt und die eluierten Sterine photometrisch bestimmt.

F r e i e u n d v e r e s t e r t e S t e r i n e : 20,00 ml Acetonextrakt wurden zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 25 ml 95 % igem Äthanol gelöst und nach Zugabe von 15 ml

10 % iger äthanolischer Kalilauge 30 Min. lang am Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der Ansatz wie beschrieben mit Petroläther extrahiert und zur Trockene eingedampft. Aliquote Mengen wurden photometrisch vermessen.

2.4. Bestimmung der freien Sterine, der freien und veresterten Sterine sowie der veresterten Sterine aus dem Petrolätherextrakt (Extrakt B)

F r e i e S t e r i n e : 20,00 ml Petrolätherextrakt wurden zur Trockene eingedampft, in 2,00 ml Chloroform aufgenommen, jeweils 0,10 ml davon dc aufgetrennt, die freien Sterine wie beschrieben analog extrahiert und photometrisch vermessen.

F r e i e u n d v e r e s t e r t e S t e r i n e : 20,00 ml Petrolätherextrakt wurden im Vakuum eingedampft, in 25 ml 95 % igem Äthanol gelöst und nach Zugabe von 15 ml 10 % iger äthanolischer Kalilauge 30 Min. lang am Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der Ansatz mit Petroläther extrahiert und analog weiterverarbeitet.

V e r e s t e r t e S t e r i n e : Nach Eindampfen von 20,00 ml Petrolätherextrakt wurde der Rückstand in 25 ml Äthanol aufgenommen und in der Siedehitze mit 10 ml einer Lösung von 2 % Digitonin in 80 % igem Äthanol versetzt. Nach kurzem Kochen (1 Min.) wurden 6 ml H_2O zugesetzt und das Ganze erneut kurz zum Sieden gebracht. Der Ansatz blieb über Nacht im Kühlschrank stehen. Anschließend wurden die ausgefallenen Sterin-Digitonide über eine G 3-Fritte abgetrennt. Das Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand mit 15 ml 10 % iger Kalilauge 30 Min. lang verseift und wie beschrieben weiter behandelt.

2.5. Bestimmung der glykosidisch gebundenen Sterine aus dem entfetteten Acetonextrakt (Extrakt C)

10,00 ml des entfetteten Acetonextraktes wurden zur Trockene eingedampft. Nach Zugabe von 25 ml 2 %iger äthanolischer Schwefelsäure wurde die Lösung 15 Std. lang am Rückfluß erhitzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben.

Bei den Bestimmungen wurden jeweils 3 Vergleichsanalysen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die größte Abweichung vom Mittelwert betrug 3,6 %.

VIII. Der Petrolätherextrakt der Früchte

1. Herstellung des Petrolätherextraktes

2260 g getrocknete und gemahlene Früchte von S. albus wurden im Soxhlet mit Petroläther (40-60°C) erschöpfend extrahiert. Ausbeute: 84,75 g, entsprechend 3,75 % vom Trockengewicht.

2. Fraktionierung des Petrolätherextraktes durch Trockensäulenchromatographie

9,0 g Petrolätherextrakt wurden an 3 Kieselgel-Trockensäulen (jeweils 500 g Kieselgel, Länge der Säule: 1,10 m, Durchmesser: 3 cm) mit Toluol/Petroläther (65 : 35) chromatographiert. Die erzielte Auftrennung ist in Tabelle 28 zusammengefaßt.

Tabelle 28 : Fraktionierung des Petrolätherextraktes der Früchte

Fraktion	Hauptkomponenten	Gramm
A	Kohlenwasserstoffe, Triterpen-, Methylsterin-, Sterin- und Alkoholester	0,51
B	sekundäre Alkohole	0,56
	nicht identifizierte Substanzen	4,40
C	Triterpene, Methylsterine, Sterine und aliphatische Alkohole	1,45
	Sterine und nicht identif. Substanzen	1,40

3. Isolierung der neutralen und sauren Esterbestandteile sowie der Alkane

Zur Isolierung der sauren (= Fettsäuren) und neutralen (= Triterpene, Methylsterine und Sterine) Esterkomponenten wurde Fraktion A (0,51 g) mit 170 ml methanolischer KOH wie auf S. 183 beschrieben hydrolysiert. Nach Ausschütteln des Hydrolysats mit Petroläther fielen 0,400 g Unverseifbares an.

Das wäßrige Hydrolysat wurde auf pH 1-2 gebracht. Mit Petroläther wurden anschließend 52 mg Fettsäuren extrahiert.

Der unverseifbare Anteil wurde an 50 g Kieselgel mit Petroläther/Essigsäureäthylester/Toluol (80 : 15 : 5) sc aufgetrennt. Hierbei fielen 110 mg Alkane, 25 mg einer Triterpenfraktion, 8,5 mg einer Methylsterinfraktion und 12,5 mg Sterine an. Die Triterpen- und die Methylsterinfraktion

wurden durch präparative DC im System I weiter gereinigt. Danach lagen 12,2 mg Triterpene vor, die nach der gc Analyse noch von aliphatischen Alkoholen begleitet waren, sowie 2,2 mg Methylsterine. Die Sterine, die von der Säule eluiert wurden, waren dc rein.

4. Isolierung der frei vorliegenden Triterpene, Methylsterine und Sterine

Fraktion C (1,45 g) wurde an 100 g Kieselgel mit Petroläther/Essigsäureäthylester/Toluol (80 : 15 : 5) aufgetrennt. Es wurden 44,9 mg Triterpene, 9,5 mg Methylsterine und 64,9 mg Sterine erhalten. Letztere waren dc rein. Die Triterpene und die Methylsterine wurden weiter präparativ im DC-System I gereinigt. Danach lagen 18,9 mg Triterpene und 1,8 mg Methylsterine vor.

5. Sekundäre Alkohole

270 mg von Fraktion B wurden an 25 g Kieselgel mit Toluol sc gereinigt. Es fielen 108 mg dc einheitliche sekundäre Alkohole an.
Die Oxidation zu den Ketonen und die Reduktion zu den Alkanen erfolgte in der gleichen Weise wie auf S. 193ff beschrieben.

IX. Der Acetonextrakt der Früchte

1. Herstellung des Acetonextraktes

1300 g getrocknete und gemahlene Früchte wurden nach Entfettung mit Petroläther (40-60°C) mit Aceton im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Ausbeute: 115,2 g (= 8,86 % bezogen auf das Trockengewicht).

2. Fraktionierung des Acetonextraktes

Zur Isolierung der Ursol- und Oleanolsäure, der 2α-Hydroxyursolsäure sowie der Acylsteringlykoside und Steringlykoside wurden 5,5 g des entfetteten Acetonextraktes an 450 g Kieselgel sc aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente Chloroform, dem steigende Mengen an Methanol zugesetzt wurden. Die aufgefangenen Fraktionen (20 ml) wurden in den Systemen XIII und XIV dc untersucht. In Tabelle 29 ist die Auftrennung wiedergegeben.

Tabelle 29 : Fraktionierung des Acetonextraktes der Früchte durch Säulenchromatographie an Kieselgel

Elutionsmittel	Fraktion	Hauptkomponenten	Gramm
Chloroform		Ursol- und Oleanolsäure, nicht identif. Substanzen	0,19
	A	Ursol- und Oleanolsäure	0,23
Chloroform + 1 % Methanol		nicht identif. Substanzen	0,14
Chloroform + 2 % Methanol	B	Acylsteringlykoside, 2α-Hydroxyursolsäure	0,07
		Acylsteringlykoside, 2α-Hydroxyursolsäure, nicht identif. Substanzen	0,06
Chloroform + 10 % Methanol	C	Steringlykoside	0,22
Methanol		nicht identif. Substanzen	3,58

In Fraktion A fielen 230 mg dc reine Ursol- und Oleanolsäure an. Fraktion B wurde zur Isolierung der Acylsteringlykoside

und der 2α-Hydroxyursolsäure herangezogen. 70 mg wurden sc an Kieselgel mit Toluol/Aceton (7 : 3), anschließend durch präparative DC mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch gereinigt. Danach lagen 20,9 mg dc einheitliche Acylsteringlykoside und 20,5 mg 2α-Hydroxyursolsäure vor.
Zur Reinigung der Steringlykoside wurden 80 mg von Fraktion C in Methanol umkristallisiert. Neben einer verunreinigten Steringlykosidfraktion fielen 21 mg dc rein an.

K. Literaturverzeichnis *

ACKMAN, R.G.: J. Gas Chromatogr. 2, 173-179 (1964), zitiert nach R. KAISER: Chromatographie in der Gasphase; IV. Quantitative Auswertung; S. 200, Bibliographisches Institut, Mannheim 1965

ADLER, G. u. Z. KASPRZYK: Free sterols, steryl esters, glucosides, acylated glucosides and water-soluble complexes in Calendula officinalis; Phytochemistry 14, 627-631 (1975)

AGARWAL, S.K. u. R.P. RASTOGI: Hederagenic acid and other constituents of Viburnum erubescens; Phytochemistry 13, 666-668 (1974)

AHMED, S., F.M. HAMMODA u. A.M. RIZK: Phytochemical investigation of Solanum laciniatum Aiton lipid fraction; Pharmazie 32, 47 (1977)

ALCAIDE, A., M. DEVYS, J. BOTTIN, M. FETIZON, M. BARBIER u. E. LEDERER: Sur la biosynthèse des stérols du tabac Nicotiana tabacum à partir du méthylène-24 cholestérol et du méthylène-24 dihydrolanostérol; Phytochemistry 7, 1773-1777 (1968)

AMYOT, T.E.: Poisoning by snowberries; Br. Med. J. 986 (1885)

APLIN, R.T. u. G.M. HORNBY: Application of mass spectrometry to the structural investigation of 9,19-cyclosterols and triterpenes; J. Chem. Soc. B 1078-1079 (1966)

---

* Die Abkürzungen der Fachzeitschriften erfolgten nach den Angaben des Chemical Abstracts Service Source Index

AUDIER, H.E., R. BEUGELMANS u. B.C. DAS: Mass spectrometry of tetracyclic triterpenes, Part II. The lanostane group: influence of the 9 : 19-cyclopropane ring; Tetrahedron Lett. 36, 4341-4347 (1966)

AUF dem KELLER, S., P. PACHALY u. F. ZYMALKOWSKI: Ursolsäure und Uvaol als Inhaltsstoffe von Rhododendron ponticum; Arch. Pharm. 3, 243-248 (1970)

AYENGAR, K.N.N., S. RANGASWAMI: Occurence of 31-Norcycloartanol in Smilax aspera Linn.; Tetrahedron Lett. 37, 3567-3570 (1967)

BACHELOR, F.W., A.B. PARALIKAR u. S.A. TELANG: Alkanes of three Artemisia species; Phytochemistry 11, 442 (1972)

BAISTED, D.J., R.L. GARDNER u. L.A. MCREYNOLDS: Phytosterol biosynthesis from lanosterol in Euphorbia peplus; Phytochemistry 7, 945-949 (1968)

BANDARANAYAKE, W.M., S.KARUNANAYAKE, S. SOTHEESWARAN, M.U.S. SULTANBAWA u. S. BALASUBRAMANUAM: Triterpenoid taxonomic markers for Stemonoporus and other genera of the Dipterocarpaceae; Phytochemistry 16, 699-701 (1977)

BASSETT, I.J. u. C.W. CROMPTON: Pollen morphology of the family Caprifoliaceae in Canada; Pollen Spores 12, 365-380 (1970)

BENSON, L.: Plant classification, 2. Ausg.; D.C. Heath and Company Lexington, Massachusetts, Toronto 1979

BENTHAM, G. u. J.D. HOOKER: Genera Plantarum II.; REEVE & Co., London 1873

BENVENISTE, P., L. HIRTH u. G. OURISSON: La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés in vitro - II. Particularités de la biosynthèse des phytostérols des tissus de tabac cultivés in vitro; Phytochemistry 5, 45-58 (1966)

BENVENISTE, P., M.J.E. HEWLINS u. B. FRITIG: La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés in vitro; Cinétique de formation des stérols et de leurs précurseurs; Eur. J. Biochem. 9, 526-533 (1969)

BERGMAN, J., B.O. LINDGREN u. C.M. SVAHN: Triterpenes and 4α-methylsterols in birch wood; Acta Chem. Scand. 19, 1661-1666 (1965)

BERI, R.M. u. H.W. LEMON: Chemical examination of the wax from needles of black spruce (Picea mariana) and balsam fir (Abies balsamea); Can. J. Chem. 48, 67-69 (1970)

BLOMQUIST, G.J., C.L. SOLIDAY, B.B. BYERS, J.W. BRAKKE u. L.L. JACKSON: Cuticular lipids of insects: V. Cuticular wax esters of secondary alcohols from the grasshoppers Melanoplus packardii and Melanoplus sanguinipes; Lipids 7, 356-362 (1972)

BOAS, F.: Second general report on the Indians of British Columbia; in Sixth report on the north-western tribes of Canada, British association for the advancement of science, Leeds Meeting, London 1890

BOHM, B.A. u. C.W. GLENNIE: A chemosystematic study of the Caprifoliaceae; Can. J. Bot. 49, 1799-1807 (1971)

BRAUN, H.: Heilpflanzen-Lexikon für Ärzte und Apotheker, 3. Aufl.; G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York 1978

BRIDEL, M.M.: Sur les pectines retirées des fruits de Lonicera xylosteum L., de Symphoricarpos racemosus L. et de Tamus communis L.; J. Pharm. Chim. 26, 536-543 (1907)

BRIESKORN, C.H. u. K. FEILNER: Zum Aufbau des pflanzlichen Abschlußgewebes: Die normalen und verzweigten Alkane von Marrubium vulgare L.; Phytochemistry 7, 485-492 (1968)

BRIESKORN, C.H. u. Z. KAPADIA: Bestandteile von Salvia officinalis. XXIV. Triterpenalkohole, Triterpensäuren und Pristan im Blatt von Salvia officinalis L.; Planta Med. 38, 86-90 (1980)

BROWN, H.C. u. C.P. GARG: A simple procedure for the chromic acid oxidation of alcohols to ketones of high purity; J. Am. Chem. Soc. 83, 2952-2953 (1961)

BUDZIKIEWICZ, H., J.M. WILSON u. C. DJERASSI: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes; J. Am. Chem. Soc. 85, 3688-3699 (1963)

CATTEL, L., C. ANDING u. P. BENVENISTE: Cyclisation of 1-trans-1'-norsqualene-2,3-epoxide and 1-cis-1'-norsqualene-2,3-epoxide by a cell free system of corn embryos; Phytochemistry 15, 931-935 (1976)

CATTEL, L., G. BALLIANO, F. VIOLA u. O. CAPUTO: The mechanism of alkylation at C-24 during the C_{29} sterol biosynthesis in Cucurbita maxima seedlings; Planta Med. 38, 112-120 (1980)

CHANG, S.Y. u. G. GRUNWALD: Duvatrienediol, alkanes, and fatty acids in cuticular wax of tobacco leaves of various physiological maturity; Phytochemistry 15, 961-963 (1976)

CHAPMAN-TURNER, A.N. u. M.A.M. BELL: The ethnobotany of the coast salish indians of Vancower Island; Econ. Bot. 25, 63-99 (1971)

CHARLES, G., T. NJIMI, G. OURISSON, J.-D. EHRHARDT, C. CONREUR, A. CAVE u. R. GOUTAREL: Alcaloïdes stéroïdiques XCIV: Stéroïdes et alcaloïdes des graines de Funtumia elastica (Stapf) et de Funtumia latifolia (Stapf): Cycloarténol, nor-31 lanostérol, déhydro-24 lophénol, desmostérol et irehdiamines; C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C 268, 2105-2108 (1969)

CHAVANT, L., H. COMBIER u. J. CROS: Symphoricarpus racemosus (Michaux) recherches phytochemiques et étude de la toxicité du fruit; Plant. Med. Phytother. 4, 267-272 (1975)

CHIARLO, B., P. AMBROSETTI u. A. BOLLA: The constituents of the drupes of Sambucus ebulus. II. Fatty acids, sterols, aliphatic and triterpenic alcohols; Chromatographia 12, 494-495 (1979)

COLE, A.R.H.: Infrared spectra of natural products; Fortschr. Chem. Org. Naturst. 13, 53-57 (1956)

COMEAU, L.C. u. J.A. BRAUN: Sur la structure d'un hétéroside commun à quelques Mimosacées de l'ouest africain. I.-Structure de l'aglycone: études préliminaires; Bull. Soc. Chim. Fr. 3-4, 716-720 (1974)

CONNOLLY, J.D. u. K.H. OVERTON: The triterpenoids; in Chemistry of Terpenes and Terpenoids, Academic Press, London-New York 1972

CORRIGAN, D., R.F. TIMONEY u. D.M.X. DONNELLY: Iridoids and alkanes in twelve species of Galium and Asperula; Phytochemistry 17, 1131-1133 (1978)

CRONQUIST, A.: The evolution and classification of flowering plants; London-Edinburgh 1968

CROTEAU, R. u. I.S. FAGERSON: The chemical composition of the cuticular wax of cranberry; Phytochemistry 10, 3239-3245 (1971)

DAHLGREN, R.: A system of classification of the angiosperms to be used to demonstrate the distribution of characters; Bot. Not. 128, 119-147 (1975)

DANJOU, E.: Anwendung der biochemischen Methode zur Auffindung und Bestimmung des Rohrzuckers und der Glykoside in den Pflanzen der Familie der Caprifoliaceen; Arch. Pharm. 245, 200-210 (1907)

DE CANDOLLE, A.P.: Caprifoliaceae; in Prodromus Plantarum, Paris, 4, 321-340 (1830)

DE VOS, F.: The stem anatomy of some species of Caprifoliaceae with reference to the phylogeny and identification of the species; Thesis Ph. D. Cornell University 1951

DEVYS, M., A. ALCAIDE, F. PINTE u. M. BARBIER: Nor-31 cycloartenol dans le pollen de cactus Carnegiea gigantea (Engelm.) Britt. et Rose ; Tetrahedron Lett. 53, 4621-4622 (1970)

DIBBERN, H.W., D. OTT u. E. WIRBITZKI: Quantitative Dünnschichtchromatographie mit einfachen Mitteln; Dtsch. Apoth. Ztg. 111, 1649-1651 (1971)

DJERASSI, C., H. BUDZIKIEWICZ u. J.M. WILSON: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems unsaturated pentacyclic triterpenoids; Tetrahedron Lett. 7, 263-270 (1962)

DRAGENDORFF, G.: Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten; W. Fritsch Verlag, München 1967

EGLINTON, G., A.G. GONZALEZ, R.J. HAMILTON u. R.A. RAPHAEL: Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plant leaves: A taxonomic survey; Phytochemistry 1, 89-102 (1962)

EGLINTON, G. u. R.J. HAMILTON: The distribution of alkanes; in Chemical Plant Taxonomy, Academic Press, London-New York 1963

EGLINTON, G. u. R.J. HAMILTON: Leaf epicuticular waxes; Science 156, 1322-1335 (1967)

EHRENDORFER, F.: Spermatophyta; in STRASSBURGER: Lehrbuch der Botanik, 31. Aufl., Fischer Verlag, Stuttgart 1978

EHRHARDT, J.D., L. HIRTH u. G. OURISSON: Études sur les tritèrpenes précurseurs des phytostérols. Recherche du cycloarténol et du lanostérol dans diverses espèces végétales; Phytochemistry 6, 815-821 (1967)

EICHENBERGER, W.: Steryl glycosides and acylated steryl glycosides; in Lipids and lipid polymers in higher plants, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977

EICHENBERGER, W. u. E.C. GROB: Über die quantitative Bestimmung von Sterinderivaten in Pflanzen und die intrazelluläre Verteilung der Steringlycoside in Blättern; FEBS Lett. 11, 177-180 (1970)

ELBEIN, A.D. u. W.T. FORSEE: Biosynthesis and structure of glycosyl diglycerides, steryl glucosides, and acylated steryl glucosides; Lipids 10, 427-436 (1975)

EL-MOGHAZY SHOAIB, A.M., A.A. ALI, C.S. GOMAA u. S.A. ROSS: A note on cyanogenetic glucoside, nitrogenous base and lipids of Sambucus nigra L. growing in Egypt; Egypt. J. Pharm. Sci. 13, 255-259 (1972)

EPPENBERGER, U., L. HIRTH u. G. OURISSON: Anaerobische Cyclisierung von Squalen-2,3-epoxyd zu Cycloartenol in Gewebekulturen von Nicotiana tabacum L.; Eur. J. Biochem. 8, 180-183 (1969)

EVANS, F.J.: Steryl esters of Digitalis purpurea L. herb.; J. Pharm. Pharmacol. 25, 156-163 (1973)

Fischer, F. u. R. HERTEL: Dünnschichtchromatographie isomerer Triterpene an Anasil B und Kieselgel/$AgNO_3$; J. Chromatogr. 38, 274-281 (1968)

FOURNIER, F.: Plantes médicinales et vénéneuses de France. T.III; Lechevallier Ed., Paris 1948

FRIEDEL, A., J.L. SCHULTZ u. A.G. SHARKEY: Mass spectra of alcohols; Anal. Chem. 28, 926-934 (1956)

FRITSCH, C.: Die Gattungen der Caprifoliaceen; Bot. Centralbl. 50, 137-139 (1892)

FROHNE, D. u. U. JENSEN: Systematik des Pflanzenreiches, 2. Aufl.; Fischer Verlag, Stuttgart-New York 1979

FUJINO, Y. u. M. OHNISHI: Characterization and composition of sterols in the free and esterified sterol fractions of Aspergillus oryzae; Lipids 14, 663-668 (1979)

FUKUOKA, N.: Taxonomic study of the Caprifoliaceae; Mem. Fac. Sci., Kyoto Univ., Ser. Biol. 6, 15-58 (1972)

GARNIER, G., L. BEZANGER-BEAUQUESNE u. G. DEBRAUX: Ressources médicinales de la flore de France; Vigot Ed., Paris 1961

GESSNER, O. u. G. ORZECHOWSKI: Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, 3. Aufl.; C. Winter Universitätsverlag, Heidelberg 1974

GHISALBERTI, E.L., N.J. DE SOUZA, H.H. REES, L.J. GOAD u. T.W. GOODWIN: Biological removal of the 4α-methyl group during the conversion of cycloartanol into 31-norcycloartanol in Polypodium vulgare Linn.; Chem. Commun. 1403-1405 (1969)

GIBBONS, G.F., L.J. GOAD, T.W. GOODWIN u. W.R. NES: Concerning the role of lanosterol and cycloartenol in steroid biosynthesis; J. Biol. Chem. 246, 3967-3976 (1971)

GIBBONS, G.F., K.A. MITROPOULOS u. K. RAMANANDA: A method for the rapid qualitative and quantitative analysis of 4,4-dimethyl sterols; J. Lipid Res. 14, 589-592 (1973)

GIBBS, R.D.: Biochemistry as an aid to establishing the relationship of some families of dicotyledonous plants; Proc. Linn. Soc. London 169, 216-230 (1956/1957)

GIBBS, R.D.: Chemotaxonomy of flowering plants; Vol. II, 1265-1271 (1974)

GLASER, A., A. GRIMMER, E. JANTZEN u. H. OERTEL: Eine Methode zur Bestimmung der Fettsäuren des Humanblutes unter besonderer Berücksichtigung der in geringen Mengen vorkommenden Fettsäuren; Biochem. Z. 336, 274-280 (1962)

GLEN, A.T., W. LAWRIE, J. MCLEAN u. M. EL-GARBY YOUNES: Triterpenoid constituents of rose-bay willow-herb; J. Chem. Soc. C 510-515 (1967)

GOAD, L.J.: The biosynthesis of plant sterols; in Lipids and lipid polymers in higher plants, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977

GOAD, L.J., B.L. WILLIAMS u. T.W. GOODWIN: Studies on phytosterol biosynthesis. The presence of 4α,14α-dimethyl-$\Delta^{8,24(28)}$-ergosta-dien-3ß-ol in grapefruit peel and its co-occurrence with cycloeucalenol in higher plant tissues; Eur. J. Biochem. 3, 232-236 (1967)

GOAD, L.J., J.R. LENTON, F.F. KNAPP u. T.W. GOODWIN: Phytosterol side chain biosynthesis; Lipids 9, 582-595 (1974)

GONZALEZ, A.G. u. M.L.G. MORA: Latex of Canary Island euphorbias. VI. Germanicol and lanosterol from the latex of Euphorbia balsamifera; C. A. 48, 7039 (1954)

GOODWIN, T.W.: The carotinoids; in Comparative Phytochemistry, Academic Press, London-New York 1966

GOULSTON, G., E.I. MERCER u. L.J. GOAD: The identification of 24-methylene-24,25-dihydrolanosterol and other possible ergosterol precursors in Phycomyces blakesleeanus and Agaricus campestris; Phytochemistry 14, 457-462 (1975)

GRESHOFF, M.: Phytochemical investigations at kew; Bull. Misc. Inf., Kew 10, 397-436 (1909)

GRILANC, P. u. D. MILIVOJEVIĆ: Mass spectrometric identification of oleanolic and ursolic acids; Org. Mass Spectrom. 7, 117-118 (1973)

GRIMM, H.J.: Über die Inhaltsstoffe des Petrolätherauszuges der Wurzel von Sambucus ebulus L.; Dissertation, Universität Würzburg 1974

GRUNWALD, C.: Plant sterols; Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 209-236 (1975)

GRUNWALD, C.: Steryl glycoside biosynthesis; Lipids 13, 697-703 (1978)

GUNASEKERA, S.P., V. KUMAR, M.U.S. SULTANBAWA u. S. BALASUBRAMANIAM: Triterpenoids and steroids of some Sapotaceae and their chemotaxonomic significance; Phytochemistry 16, 923-926 (1977)

GUPTA, M.B., R. NATH, N. SRIVASTAVA, K. SHANKER, K. KISHOR u. K.P. BHARGAVA: Anti-inflammatory and antipyretic activities of ß-sitosterol; Planta Med. 39, 157-163 (1980)

HÄNSEL, R. u. M. KUSSMAUL: Zwei Triterpene aus den Holunderblüten; Arch. Pharm. 308, 790-792 (1975)

HALSALL, T.G. u. R.T. APLIN: A pattern of development in the chemistry of pentacyclic triterpenes; Fortschr. Chem. Org. Naturst. 22, 153-202 (1964)

HARBORNE, J.B.: The evolution of flavonoid pigments in plants; in Comparative Phytochemistry, Academic Press, London-New York 1966

HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen; Bd. III, 365-373 (1964), Birkhäuser-Verlag, Basel-Stuttgart

HEINTZ, R. u. P. BENVENISTE: Cyclisation de l'époxyde-2,3 de squalène par des microsomes extraits de tissus de tabac cultivés in vitro; Phytochemistry 9, 1499-1503 (1970)

HEINTZ, R. u. P. BENVENISTE: Plant sterol metabolism. Enzymatic cleavage of the 9ß,19ß-cyclopropane ring of cyclopropyl sterols in bramble tissue cultures; J. Biol. Chem. 249, 4267-4274 (1974)

HERRMANN, P. u. B. TOLLENS: Über den Zucker der Schneebeeren (Symphoricarpus racemosus (Michaux)); Liebigs Ann. Chem. 230, 50-55 (1885)

HEWLINS, M.J.E., J.D. EHRHARDT, L. HIRTH u. G. OURISSON: The conversion of (^{14}C) cycloartenol and (^{14}C) lanosterol into phytosterols by cultures of Nicotiana tabacum; Eur. J. Biochem. 8, 184-188 (1969)

HILLEBRAND, G.R. u. D.E. FAIRBROTHERS: Phytoserological systematic survey of the Caprifoliaceae; Brittonia 22, 125-133 (1970a)

HILLEBRAND, G.R. u. D.E. FAIRBROTHERS: Serological investigation of the systematic position of the Caprifoliaceae. I. Correspondence with selected Rubiaceae and Cornaceae; Am. J. Bot. 57, 810-815 (1970b)

HOLLOWAY, P.J., C.E. JEFFREE u. E.A. BAKER: Structural determination of secondary alcohols from plant epicuticular waxes; Phytochemistry 15, 1768-1770 (1976)

HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH, 3. Aufl., Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart 1958

HUNECK, S. u. G. SNATZKE: Triterpene IX. Über die Triterpene aus der Rinde von Sambucus nigra L. und die Darstellung von 3-epi-Ursolsäure; Chem. Ber. 98, 120-125 (1965a)

HUNECK, S. u. G. SNATZKE: Triterpene XVI. Über die Triterpene aus der Rinde von Sambucus racemosa L.; Phytochemistry 4, 777-778 (1965b)

HUSEMANN, T.: Handbuch der Toxikologie, 2. Bd.; G. Riemer-Verlag, Berlin 1862

HUTCHINSON, J.: The family of flowering plants. Dicotyledons, 3. Ausg.; Clarendon Press, Oxford 1973

IDLER, D.R., S.W. NICKSIC, D.R. JOHNSON, V.W. MELOCHE, H.A. SCHUETTE u. C.A. BAUMANN: Separation and tentative identification of two new sterols from oats; J. Am. Chem. Soc. 75, 1712-1715 (1953)

IKAN, R.: Thin-layer chromatography of tetracyclic triterpenes on silica impregnated with silver nitrate; J. Chromatogr. 17, 591-593 (1965)

INOUE, T. u. K. SATO: Triterpenoids of Sambucus nigra and S. canadensis; Phytochemistry 14, 1871-1872 (1975)

ITOH, T., T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Sterol composition of 19 vegetable oils; J. Am. Oil Chem. Soc. 50, 122-125 (1973)

ITOH, T., T. TAMURA, T. IIDA u. T. MATSUMOTO: Gas chromatographic differentiation of 4-desmethyl, 4-monomethyl and 4,4-dimethylsterols; Steroids 23, 687-698 (1974a)

ITOH, T., T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Sterols, methylsterols, and triterpene alcohols in three Theaceae and some other vegetable oils; Lipids 9, 173-184 (1974b)

ITOH, T., T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: The occurrence of 24-methylenelanost-8-en-3ß-ol in the seeds of Brassica napus; Phytochemistry 15, 1781-1782 (1976a)

ITOH, T., T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Tirucalla-7,24-dienol: a new triterpene alcohol from tea seed oil; Lipids 11, 434-441 (1976b)

ITOH, T., T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Triterpene alcohols in the seeds of Solanaceae; Phytochemistry 16, 1723-1726 (1977a)

ITOH, T., T.M. JEONG, Y. HIRANO, T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Occurrence of lanosterol and lanostenol in seeds of red pepper (Capsicum annuum); Steroids 29, 569-577 (1977b)

ITOH, T., T. TAMURA, T. MITSUHASHI u. T. MATSUMOTO: Sterols of Liliaceae; Phytochemistry 16, 140-141 (1977c)

ITOH, T., T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Triterpene alcohols and sterols in the seeds of Brassica napus; Fette, Seifen, Anstrichm. 10, 382-386 (1978a)

ITOH, T., T. ISHII, T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Four new and other 4α-methylsterols in the seeds of Solanaceae; Phytochemistry 17, 971-977 (1978b)

ITOH, T., T. UETSUKI, T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Characterization of triterpene alcohols of seed oils from species of Theaceae, Phytolaccaceae and Sapotaceae: Lipids 15, 407-411 (1980)

JANISZOWSKA, W.E., E. SOBOCINSKA u. Z. KASPRZYK: Distribution of different forms of sterols in three cellular subfractions of Calendula officinalis leaves; Phytochemistry 18, 427-430 (1979)

JANSSON, P.E., L. KENNE, H. LINDGREN, B. LINDBERG u. U.J. LÖNNGREN: A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates; Chem. Commun. 8, 1-75 (1976)

JANTZEN, E. u. H. ANDREAS: Reaktion ungesättigter Fettsäuren mit Quecksilber(II)-acetat; Anwendung für präparative Trennungen,I; Chem. Ber. 92, 1427-1437 (1959)

JEONG, T.M., T. ITOH, T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Analysis of sterol fractions from twenty vegetable oils; Lipids 9, 921-927 (1974)

JEONG, T.M., T. ITOH, T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Sterols from a species of Pichia, a n-alkane-utilizing yeast; Steroids 25, 741-751 (1975a)

JEONG, T.M., T. ITOH, T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Analysis of methylsterol fractions from twenty vegetable oils; Lipids 10, 634-640 (1975b)

JOHANSSON, A.: The content and composition of sterols and sterol esters in sunflower and poppy seed oils; Lipids 14, 285-291 (1979)

JOHNSON, J.L., M.F. GROSTIC u. A.O. JENSEN: Determination of of stigmasterol in soybean sterol mixtures by infrared method; Anal. Chem. 29, 468-470 (1957)

KAISER, R.: Chromatographie in der Gasphase. IV. Quantitative Auswertung; Bibliographisches Institut Mannheim 1965

KATING, H., W. RINN u. G. WILLUHN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. III. Die Fettsäuren in den ätherischen Ölen der Blüten verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 18, 130-146 (1970)

KNAPP, F.F. u. H.J. NICHOLAS: Phytosterol biosynthesis in banana peel. Initial removal of the 4α-methyl group of 24-methylencycloartanol during its conversion into cycloeucalenol in Musa sapientum; Chem. Commun. 399-400 (1970)

KNAPP, F.F. u. H.J. NICHOLAS: The biosynthesis of phytosterols in Musa sapientum; Phytochemistry 10, 85-95 (1971)

KNIGHTS, B.A.: Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry; J. Gas Chromatogr. 5, 273-282 (1967)

KÖSTENS, J.: Die Triterpenoide, Sterine und Sterinderivate von Solanum dulcamara L.; Dissertation, Universität Marburg 1973

KÖSTENS, J. u. G. WILLUHN: Steringlykoside und Acyl-Steringlykoside in Blättern von Solanum dulcamara; Planta Med. 24, 278-285 (1973)

KOLATTUKUDY, P.E.: Plant waxes; Lipids 5, 259-275 (1970a)

KOLATTUKUDY, P.E.: Composition of the surface lipids of pea leaves (Pisum sativum); Lipids 5, 398-402 (1970b)

KOLATTUKUDY, P.E., J.S. BUCKNER u. T.J. LIU: Biosynthesis of secondary alcohols and ketones from alkanes; Arch. Biochem. Biophys. 156, 613-620 (1973)

KRAFT, M.: Struktur- und Absorptionsspektroskopie der Steroide und Alkaloide; Thieme Verlag, Stuttgart 1975

LAWRIE, W., J. MCLEAN u. A.C. PATON: Triterpenoids in the bark of elder (Sambucus nigra); Phytochemistry 3, 267-268 (1964)

LEDERER, E.: Some problems concerning biological C-alkylation reactions and phytosterol biosynthesis; Quart. Rev. 23, 453-481 (1969)

LEPAGE, M.: Isolation and characterization of an esterified form of steryl glucoside; J. Lipid Res. 5, 587-592 (1964)

LIEBENOW,H. u. K. LIEBENOW: Giftpflanzen; F. Enke Verlag, Stuttgart 1973

LITCHFIELD, J.T. u. F.W. WILCOXON: Simplified methods for evaluating dose-effects experiments; J. Pharmacol. Exp. Ther. 96, 99-113 (1949)

LOEV,B. u. M.M. GOODMAN: Dry-column chromatography: A preparative chromatographic technique with the resolution of thin-layer chromatography; Chem. Ind. (London) 2026-2032 (1967)

LUCKNER, M.: Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier; G. Fischer Verlag, Stuttgart 1969

MACEY, M.J.K. u. H.N. BARBER: Chemical genetics of wax formation on leaves of Brassica oleracea; Phytochemistry 9, 13-23 (1970)

MADAUS,G.: Lehrbuch der biologischen Heilmittel III; G. Olms Verlag, Hildesheim-New York 1976

MANGOLD, H.K. u. R. KAMMERECK: Separation, identification, and qualitative analysis of fatty acids by thin-layer chromatography and gas-liquid chromatography; Chem. Ind. (London) 1032-1034 (1961)

MANHEIM, B.S. u. T.W. MULROY: Triterpenoids in epicuticular waxes of Dudleya species; Phytochemistry 17, 1799-1800 (1978)

MARCO, J.A., J.S. PARAREDA, E. SEOANE, B. ABARCA u. J.M. SENDRA Waxes, triterpenes and free acids in Anthyllis sericea; Phytochemistry 17, 1438 (1978)

MARTIN-SMITH, M., G. SUBRAMANIAN u. H.E. CONNOR: Surface wax components of five species of Cortaderia (Gramineae)- a chemotaxonomic comparison; Phytochemistry 6, 559-572 (1967)

MASSEY, I.J. u. C. DJERASSI: Structural and stereochemical applications of mass spectrometry in the marine sterol field. Synthesis and electron impact induced mass spectral fragmentation of Δ^{24}- and $\Delta^{24(28)}$-3ß-Hydroxy-Δ^{5}-sterols; J. Org. Chem. 44, 2448-2456 (1979)

MATSUO, A., M. NAKAYAMA, S. HAYASHI u. S. NISHIMOTO: Isolation of n-paraffins and sec-alcohols from Isotachis japonica; Phytochemistry 11, 3313-3316 (1972)

MUCCINO, R.R. u. C. DJERASSI: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CCXXXIX. Elucidation of the ring D cleavage in lanostane; J. Am. Chem. Soc. 23, 556-570 (1974)

NAGASAMPAGI, B.A., J.W. ROWE, R. SIMPSON u. L.J. GOAD: Sterols of coffee; Phytochemistry 10, 1101-1107 (1971)

NEIDLEIN, R. u. V. DALDRUP: Untersuchungen über Inhaltsstoffe von Lippia americana, 2. Mitt.; Arch. Pharm. 313, 97-108 (1980)

NEIDLEIN, R. u. E. KOCH: Isolierung und Struktur der Inhaltsstoffe von Cecropia adenopus Martius, 2. Mitt.; Arch. Pharm 313, 199-207 (1980)

NES, W.R., K. KREVITZ, J. JOSEPH, W.D. NES, B. HARRIS, G.F. GIBBONS u. G.W. PATTERSON: The phylogenetic distribution of sterols in tracheophytes; Lipids 12, 511-527 (1977)

NGHIA, N.V., L. BÉZANGER-BEAUQUESNE u. M. TORCK: Recherches sur la charactérisation des flavonoïdes; Plant. Med. Phytother. 3, 177-187 (1971)

NICOLAS, A., J. BASCOUL, A.C. DE PAULET u. P.D.G. DEAN: Conversion of squalene-2(3) epoxide by enzymes of Alnus glutinosa; Phytochemistry 14, 2407-2409 (1975)

NICOTRA, F., F. RONCHETTI, G. RUSSO, G. LUGARO u. M. CASELLATO: Stereochemistry of hydrogen migration from C-24 during isofucosterol biosynthesis in Pinus pinea; J. Chem. Soc. Chem. Commun. 889-890 (1977)

NIELSEN, P.E., H. NISHIMURA, Y. LIANG u. M. CALVIN: Steroids from Euphorbia and other latex-bearing plants; Phytochemistry 18, 103-104 (1979)

NORDBY, H.E. u. S. NAGY: Fatty acid composition of sterol esters from Citrus sinensis, C. paradisi, C. limon aurantiafolia and C. limettioides sacs; Phytochemistry 13, 443-452 (1974)

NOWAK, G. u. J. ZELLNER: Beiträge zur vergleichenden Pflanzenchemie. II. Über die Beerenfrüchte einiger Caprifoliaceen; Monatsh. Chem. 42, 293-310 (1922)

OKUDA, T., T. YOSHIDA u. N. TOH: Esterified sterol glucoside and methylellagic acids from Aleurites fordii fruits; Phytochemistry 14, 2513-2514 (1975)

OSKINA, L.D.: An attempt to construct a system of the Caprifoliaceae based on the analysis of morphological structure; Byull. Mosk. Ova. Ispyt. Prir. Otd. Biol. 77, 111-114 (1972)

OSKINA, L.D.: Karyological data and the system of Caprifoliaceae; Byull. Mosk. Ova. Ispyt. Prir. Otd. Biol. 79, 127-129 (1974)

PALMER, M.A. u. B.N. BOWDEN: The sterols and triterpenes of Sorghum vulgare grains; Phytochemistry 14, 2049-2053 (1975)

PHILIPSON, W.R.: Ovular morphology and the major classification of the dicotyledons; Bot. J. Linn. Soc. 68, 89-108 (1974)

PINHAS, H.: Triterpenic alcohols, process for their preparation and therapeutical compositions containing same; United States Patent 3, 625, 194 Dez. (1971)

PLOUVIER, M.V.: Recherche du fraxoside et d'hétérosides coumariniques voisins dans quelques groupes botaniques; C. R. Acad. Sci. D 267, 1883-1885 (1968)

PLOUVIER, M.V.: Recherche et répartition de l'acide ursolique dans quelques groupes de Dicotylédones; C. R. Acad. Sci. D 278, 323-326 (1974)

PLOUVIER, M.V.: Compléments sur la répartition de l'acide ursolique dans quelques groupes de Dicotylédones; C. R. Acad. Sci. D 280, 653-656 (1975)

PONSINET, G. u. G. OURISSON: Biosynthèse in vitro des triterpènes dans le latex d'Euphorbia; Phytochemistry 6, 1235-1243 (1967)

PONSINET, G. u. G. OURISSON: Aspects particuliers de la biosynthèse des tritèrpenes dans le latex d'Euphorbia; Phytochemistry 7, 757-764 (1968)

PONSINET, G., G. OURISSON u. A.C. OEHLSCHLÄGER: Systematic aspects of the distribution of di- and triterpenes; in Recent Advances in Phytochemistry Vol. I, Division of Meredith Corporation, New York 1968

PURDY, S.J. u. E.V. TRUTER: Taxonomic significance of surface lipids of plants; Nature 190, 554-555 (1961)

PURDY, S.J. u. E.V. TRUTER: Constitution of the surface lipid from the leaves of Brassica oleracea (var. capitata, Winningstadt). III. Nonacosane and its derivatives; Proc. Roy. Soc. London Ser. B 158, 553-565 (1963)

RADWAN, S.S., H.K. MANGOLD u. F. SPENER: Lipids in plant tissue cultures. III. Very long-chain fatty acids in the lipids of callus cultures and suspension cultures; Chem. Phys. Lipids 13, 103-107 (1974)

RAICHT, R.F., B.I. COHEN, E.P. FAZZINI, A.N. SARWAL u. M. TAKAHASHI: Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats; Cancer Res. 40, 403-405 (1980)

REES, H.H., L.J. GOAD u. T.W. GOODWIN: Isolation of a new sterol from potato leaves; Phytochemistry 7, 1875-1877 (1968a)

REES, H.H., L.J. GOAD u. T.W. GOODWIN: Cyclization of 2,3-oxidosqualene to cycloartenol in a cell-free system from higher plants; Tetrahedron Lett. 6, 723-725 (1968b)

REES, H.H., L.J. GOAD u. T.W. GOODWIN: 2,3-oxidosqualene cycloartenol cyclase from Ochromonas malhamensis; Biochim. Biophys. Acta 176, 892-894 (1969)

REHM, K.: Untersuchungen zur Analytik und über das Vorkommen von Hydroxyfettsäuren im Pflanzenreich; Dissertation, Universität München 1967

Richter, W. u. G. WILLUHN: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Sambucus nigra L.. III. Bestimmung des Ursol- und Oleanolsäure-, des Amyrin- und Steringehaltes der Flores Sambuci DAB 7; Pharm. Ztg. 122, 1567-1571 (1977)

RUBINSTEIN, I. u. L.J. GOAD: Sterols of the siphonous marine alga Codium fragile; Phytochemistry 13, 481-484 (1974)

SAX, K. u. D.A. KRIBS: Chromosomes and phylogeny in Caprifoliaceae; J. Arnold Arbor. Harv. Univ. 11, 147-153 (1930)

SCHLENK, W.: Über aliphatische Harnstoff-Addukte, eine neue Kategorie von Additionsverbindungen; Angew. Chem. 61, 447 (1949)

SCHREIBER, K. u. G. OSSKE: Isolierung von Cycloartenol aus den Blättern der Kulturkartoffel Solanum tuberosum L.; Sterine und Triterpene II. Mitt.; Kulturpflanze 10, 372-381 (1962)

SEKULA, B.C. u. W.R. NES: The identification of cholesterol and other steroids in Euphorbia pulcherimma; Phytochemistry 19, 1509-1512 (1980)

SENDRA, J. u. Z. JANECZKO: ß-Sitosterol and oleanolic acid in leaves of Symphoricarpos racemosus Hooker; Pol. J. Pharmacol. Pharm. 25, 607-610 (1973)

SETHI, V.K., M.P. JAIN u. R.S. THAKUR: Constituents of Viburnum nervosum Hook; Indian J. Pharm. 39, 168 (1977)

SMITH, C.B.: The fruit of Symphoricarpus racemosus, or snowberry; Chem. News 107, 266 (1913)

SNATZKE, G., F. LAMPERT u. R. TSCHESCHE: Über Triterpene - VIII. Zuordnung von Triterpenen zu den Grundtypen durch IR Spektroskopie; Tetrahedron 18, 1417-1431 (1962)

SPITELLER, G.: Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen; Verlag Chemie, Weinheim 1966

STAHL, E. u. U. KALTENBACH: Dünnschichtchromatographie, VI. Mitteilung. Spurenanalyse von Zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten; J. Chromatogr. 5, 351-355 (1961)

SUCROW, W.: Inhaltsstoffe von Momordica charantia L., $\Delta^{5,25}$-Stigmastadienol-(3ß) und sein ß-D-Glucosid; Chem. Ber. 99, 2765-2777 (1966)

SUNESON, S.: Zur Embryologie der Gattung Viburnum; Bot. Not. 181-194 (1933)

SZAUFFER, M., Z. KOWALEWSKI u. J.D. PHILLIPSON: Chelidonine from Symphoricarpos albus; Phytochemistry 17, 1446-1447 (1978)

TAKAGI, T., A. SAKAI, K. HAYASHI u. Y. ITABASHI: Occurrence of plant sterols in aquatic vertebrates; Lipids 14, 5-8 (1979)

TAKHTAJAN, A.: Flowering plants, origin and dispersal; Edinburgh 1969

THOMAS, A.F. u. B. WILLHALM: The triterpenes of Commiphora IV (1). Mass spectra and organic analysis V (2). Mass spectroscopic studies and the structure of commic acids A and C; Tetrahedron Lett. 43, 3177-3183 (1964)

TROLL, W. u. F. WEBERLING: Die Infloreszenzen der Caprifoliaceen und ihre systematische Bedeutung; Akad. Wiss. Lit. Mainz Abh. math.-naturw. Kl. 4, 455-605 (1966)

TSCHESCHE, R. u. G. WULFF: Chemie und Biologie der Saponine; Fortschr. Chem. Org. Naturst. 30, 461-606 (1973)

ULUBELEN, A., C.H. BRIESKORN u. N. ÖZDEMIR: Triterpenoids of Salvia horminum, constitution of a new diol; Phytochemistry 16, 790-791 (1977)

VAN DER MAAS, J.H.: Basic infrared spectroscopy; Heyden & Son LTD, 1969

VROMAN, H.E. u. C.F. COHEN: Separation of sterol acetates by column and thin-layer argentation chromatography; J. Lipid Res. 8, 150-152 (1967)

WAGENITZ, G.: Caprifoliaceae; in ENGLER's Syllabus der Pflanzenfamilien II., 12. Aufl., Gebrüder Borntträger, Berlin 1964

WAGNER, H. u. P. POHL: Zur Analytik von Polyenfettsäuren II; Biochem. Z. 340, 337-344 (1964)

WALDI, D.: Dünnschichtchromatographie. DC einiger Zucker und Zuckeralkohole; J. Chromatogr. 18, 417-418 (1965)

WALLER, G.: Biochemical applications of mass spectrometry; Willy-Interscience 1972

WAN, A.S., R.T. AEXEL, R.B. RAMSEY u. H.J. NICHOLAS: Sterols and triterpenes of the pitcher plant; Phytochemistry 11, 456-461 (1972)

WEBERLING, F.: Vergleichende und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die Haarformen der Dipsacales; Beitr. Biol. Pflanz. 53, 61-89 (1977)

WEHMER, C.: Die Pflanzenstoffe, Bd. II; Jena 1931

WEIZEL, A.: Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels durch Beta-Sitosterin; Med. Klin. 70, 242-246 (1975)

WETTSTEIN, R.: Handbuch der systematischen Botanik, 4. Aufl.; F. Deuticke, Leipzig-Wien 1935

WILKINSON, A.M.: Floral anatomy and morphology of some species of the tribes Linnaeeae and Sambuceae of the Caprifoliaceae; Am. J. Bot. 35, 365-372 (1948a)

WILKINSON, A.M.: Floral anatomy and morphology of some species of the genus Viburnum of the Caprifoliaceae; Am. J. Bot. 35, 455-465 (1948b)

WILKINSON, A.M.: Floral anatomy and morphology of some species of the tribe Lonicereae of the Caprifoliaceae; Am. J. Bot. 35, 261-271 (1948c)

WILKINSON, A.M.: Floral anatomy and morphology of Triosteum and of the Caprifoliaceae in general; Am. J. Bot. 36, 481-489 (1949)

WILLIAMS, B.L., L.J. GOAD u. T.W. GOODWIN: The sterols of grapefruit peel; Phytochemistry 6, 1137-1145 (1967)

WILLIAMS, D.H.W. u. I. FLEMING: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung; G. Thieme Verlag, Stuttgart 1975

WILLUHN, G.: Die Alkane einiger Caprifoliaceae und ihr möglicher Wert für die Taxonomie; Pharm. Ztg. 52, 2107-2109 (1974)

WILLUHN, G.: Einige Aspekte der Biosynthese und des Stoffwechsels von Steroiden in Pflanzen; Pharm. Ztg. 121, 1491-1501 (1976)

WILLUHN, G. u.J. KÖSTENS: Solanum dulcamara L.: Triterpenoide und Sterine aus dem Petrolätherextrakt der Blätter; Planta Med. 25, 115-132 (1974)

WILLUHN, G. u. J. KÖSTENS: Die quantitative Verteilung der Sterine und Sterinderivate in Organen von Solanum dulcamara; Phytochemistry 14, 2055-2058 (1975)

WILLUHN, G. u. W. RICHTER: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Sambucus nigra. II. Die lipophilen Bestandteile der Blüten; Planta Med. 31, 328-343 (1977)

WOJCIECHOWSKI, Z.A., M. BOCHENSKA-HRYNIEWICZ, B. KUCHARCZAK u. Z. KASPRZYK: Sterol and triterpene alcohol esters from Calendula officinalis; Phytochemistry 11, 1165-1168 (1972)

WOJCIECHOWSKI, Z.A., L.J. GOAD u. T.W. GOODWIN: Sterols of the lichen Pseudevernia furfuracea; Phytochemistry 12, 1433-1436 (1973)

WOLLRAB, V.: Secondary alcohols and paraffins in the plant waxes of the family Rosaceae; Phytochemistry 8, 623-627 (1969)

WYLLIE, S.G. u. C. DJERASSI: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXLVI. Mass spectrometric fragmentations typical of sterols with unsaturated side chains; J. Org. Chem. 33, 305-313 (1968)

WYLLIE, S.G., B.A. AMOS u. L. TÖKÉS: Electron impact induced fragmentation of cholesterol and related C-5 unsaturated steroids; J. Org. Chem. 42, 725-732 (1977)

YAGI, A., K. MIHASHI u. T. TSUKAMOTO: Studies on the components of Sambucus sieboldiana Blume (I). On the benzene extract of wood of Sambucus sieboldiana Blume; Syôyakugaku Zasshi 24, 44-46 (1970)

Lebenslauf

Irmgard Gabriele Merfort	
Geburtsdatum:	18.5.1952
Geburtsort:	Vechta (Oldenburg)
Eltern:	Elisabeth Rühmer geb. Varelmann
	Felix Rühmer
Familienstand:	verheiratet seit 17.6.1977 mit
	Frank Merfort
Schulbildung:	1959-1963 Volksschule, Vechta
	1963-1971 Neusprachl. Gymnasium, Vechta
Reifeprüfung:	24.5.1971
Praktikantenzeit:	1971-1973 Löwen-Apotheke, Radevormwald
Pharm. Vorexamen:	15.6.1973 in Düsseldorf
Studium der Pharmazie:	WS 1973/74 - SS 1977 in Münster
Staatsexamen:	Erster Abschnitt: 25.9.1975
	Zweiter Abschnitt: 18.4.1977
Approbation:	29.6.1977
Promotion:	Beginn der vorliegenden Arbeit am
	1.11.1977 unter der Anleitung von
	Herrn Prof. Dr. G. Willuhn
Assistententätigkeit:	1.11.1977-30.4.1978 wiss. Hilfskraft
	ab 1.5.1978 Verwalter einer wiss.
	Assistentenstelle

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen